

Genexpressionsprofil ausgewählter leukozytärer miRNA von Mäusen verschiedenen Alters mit polymikrobieller Sepsis

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Tobias Bretschneider

geboren am 11.09.1985 in Sondershausen

Gutachter

- 1. PD Dr. Ralf Claus, Leiter des Fachbereichs Experimentelle Anästhesie, Universitätsklinikum Jena**
- 2. PD Dr. Matthias Platzer, Leiter der Genomanalyse des Leibnitz-Instituts für Altersforschung, Jena**
- 3. PD Dr. Dr. Simone Kreth, OÄ der Klinik für Anästhesiologie der LMU München, Leiterin des anästhesiologischen Forschungslabors**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.12.2013

I Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AGO	Argonaut
CAD	engl. <i>coronary arterie disease</i>
CASP	engl. <i>colon ascendens stent peritonitis</i>
CD8+	engl. <i>cluster of differentiation 8+</i>
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CSCC	engl. <i>Centre for Sepsis Control and Care</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
Cl	Chlor
CLI	engl. <i>cecal ligation and incision</i>
CLP	engl. <i>cecal ligation and puncture</i>
Ct	engl. <i>cycle threshold</i>
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DGCR8	engl. <i>DiGeorge syndrom critical region on chromosome 8</i>
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Effizienz
EC	engl. <i>endothel cells</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4F	engl. <i>eukaryotic initiation factor 4F</i>
E _{ref}	Primereffizienz des Referenzgens
FC	engl. <i>fold change</i>
GeoMittel	geometrisches Mittel

IL-1b	Interleukin-1b
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-18	Interleukin-18
ITS	Intensivstation
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KG	Körpergewicht
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
LPS	Lipopolysaccharid
M-Wert	Expressionsstabilitätswert
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinases</i>
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIAME	engl. <i>minimum information about a microarray experiment</i>
miRNA	engl. <i>micro RNA</i>
miRNP	engl. <i>micro-ribonucleoprotein</i>
MODS	engl. <i>multiple organ dysfunction syndrome</i>
Mon	Monat
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
n	Anzahl der Versuchstiere
ncRNA	engl. <i>non-coding ribonucleic acid</i>
NF-κB	engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
<i>Norm. Fluoro.</i>	engl. <i>normalized fluoreszenz</i>
Oligo-dT-Primer	Oligo-Desoxythymidin-Primer
p21	Protein 21

p53	Protein 53
P-body	engl. <i>processing body</i>
PA	engl. <i>Point-Admissible</i>
paCO ₂	arterieller Kohlendioxid-Partialdruck
PAMP	engl. <i>pathogen associated molecular patterns</i>
PCI	engl. <i>peritoneal contamination and infection</i>
pri-miRNA	engl. <i>primary-miRNA</i>
pre-miRNA	engl. <i>precursor-miRNA</i>
PRR	engl. <i>pattern recognition receptors</i>
p-Value	Überschreitungswahrscheinlichkeit
QQ-Plot	Wahrscheinlichkeitsnetz
qRT-PCR	engl. <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
r ²	Bestimmtheitsmaß
Ran-GTP	Ran-Guanin Triphosphatase
RISC	engl. <i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNA-Pol II	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
RQI	engl. <i>RNA quality indicator</i>
RT	Reverse Transkriptase
SEK	Service-Einheit-Kleinnager
sd	Standardabweichung
SIRS	engl. <i>systemic inflammatory response syndrom</i>
snRNA	engl. <i>small nuclear RNA</i>
snoRNA	engl. <i>small nucleolar RNA</i>
Tab	Tabelle
TCR	engl. <i>t-cell receptor</i>
TE	Pufferlösung bestehend aus Tris und EDTA

TEM	engl. <i>transendothelial migration</i>
TGF- β	engl. <i>transforming growth factor beta</i>
TH1-Zellen	T-Helfer Zelle 1
TLR	engl. <i>toll-like receptor</i>
T _m	Schmelztemperatur
TNF- α	engl. <i>tumour necrosis factor alpha</i>
TRBP	engl. <i>TAR RNA binding protein</i>
tRNA	engl. <i>transfer RNA</i>
UTR	engl. <i>untranslated region</i>
W _r	relativer Expressionswert W _r

Verwendete Einheiten

°C	Grad Celsius	m	Meter
g	Gramm	mmHg	Millimeter Quecksilber
g	mittlere Erdbeschleunigung	min	Minute
h	Stunde	M (mol/l)	molar
l	Liter	%	Prozent

Verwendete Präfixe

α	alpha	k	kilo
c	zenti	m	milli
Δ	delta	n	nano
f	femto	μ	mikro

II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Altersabhängiges Risiko von schwerer Sepsis und Mortalität	7
Abbildung 2: Normale Überlebenskurve von Mäusen und Menschen	9
Abbildung 3: Biogenese und Funktionsweise von miRNAs	12
Abbildung 4: MiRNA Bindung an die Ziel-mRNA	13
Abbildung 5: MiRNAs in Alterung und Inflammation	16
Abbildung 6: Anzahl der <i>Beads</i> pro <i>Beadtyp</i>	32
Abbildung 7: Intensitätsabhängige Standardabweichung	32
Abbildung 8: Fluoreszenzkurve der qRT-PCR	43
Abbildung 9: Normalisierte Fluoreszenzkurve der qRT-PCR	44
Abbildung 10: Schmelzkurve der qRT-PCR	45
Abbildung 11: Venn-Diagramm der PCI-Gruppen	53
Abbildung 12: Venn-Diagramm der <i>Sham</i> -Gruppen	54
Abbildung 13: Venn-Diagramm Behandlungseffekt PCI vs. <i>Sham</i> -Gruppe	55
Abbildung 14: Clusteranalyse der PCI-Gruppen mit Dendrogramm	56
Abbildung 15: Clusteranalyse der <i>Sham</i> -Gruppen mit Dendrogramm	58
Abbildung 16: Clusteranalyse Behandlungseffekt PCI vs <i>Sham</i> -Gruppen mit Dendrogramm	59
Abbildung 17: <i>Dot-Density-Plot</i> der PCI-Gruppen	61
Abbildung 18: <i>Dot-Density-Plot</i> der <i>Sham</i> -Gruppen	62
Abbildung 19: <i>Dot-Density-Plot</i> Behandlungseffekt PCI vs. <i>Sham</i>	63
Abbildung 20: Punktediagramm der 10 selektierten miRNA	64-65
Abbildung 21: Dendrogramme der Clusteranalyse der <i>Microarray</i> Versuche	79

	Seite
Tabelle 1: Prozentuale Häufigkeit der Bakterienspezies bei sekundärer Peritonitis	6
Tabelle 2: Nummerierung der verwendeten Mäuse	23
Tabelle 3: Mikrobiologische Analyse der gepoolten Faeces (1)	25
Tabelle 4: Mikrobiologische Analyse der gepoolten Faeces (2)	25
Tabelle 5: PAXgene Blood miRNA Kit	27
Tabelle 6: Liste der zehn ausgewählten miRNAs	36
Tabelle 7: Reagenzien für die reverse Transkription	38
Tabelle 8: Liste der ausgewählten Primer	39
Tabelle 9: Effizienzen und Bestimmtheitswerte	41
Tabelle 10: Reagenzien für die qRT-PCR	42
Tabelle 11: Zyklusprotokoll für <i>Rotor Gene 6000</i>	44
Tabelle 12: Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung	49
Tabelle 13: Ergebnis der Referenzgenanalyse	51
Tabelle 14: Relative Quantitäten und geometrisches Mittel	52
Tabelle 15: \log_2 transformierte Genexpressionsdaten aller 10 miRNA	60
Tabelle 16: Sepsisrelevante Signaltransduktionswege der Leukozyten	74
Tabelle 17: Differenziert exprimierte Gene aus der Venn-Diagramm Analyse	76

III Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	i
II	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	v
III	Inhaltsverzeichnis	vii
1	Zusammenfassung	- 1 -
2	Einleitung	- 3 -
3	Ziele der Arbeit	- 22 -
4	Methodik	- 23 -
4.1	Studiendesign	- 23 -
4.2	Tiermodell	- 24 -
4.2.1	Mausaufzucht	- 24 -
4.2.2	Polymikrobielle Sepsisinduktion	- 24 -
4.3	Blutprobenverarbeitung	- 25 -
4.3.1	<i>In vivo</i> Genexpressionsprofil Stabilisierung und Isolation	- 25 -
4.3.2	Konzentrationsbestimmung	- 27 -
4.3.3	Qualitätskontrolle	- 28 -
4.4	<i>Bead-Array</i> Genexpressionsanalyse	- 29 -
4.4.1	Versuchsaufbau	- 30 -
4.4.2	Normalisierung und statistische Auswertung	- 31 -
4.5	Selektion differenziert exprimierter miRNAs	- 34 -
4.5.1	<i>DIANA-microT-4.0 (beta version) MOUSE</i>	- 34 -
4.5.2	Dreidimensionales Schicht-Ranking	- 35 -
4.6	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR	- 36 -
4.6.1	Reverse Transkription	- 37 -
4.6.2	Primerdesign	- 38 -
4.6.3	Standardkurvenanalyse zur Effizienzbestimmung	- 40 -

4.6.4	qRT-PCR-Versuchsaufbau	- 41 -
4.6.5	Ct-Wert-Bestimmung	- 43 -
4.6.6	Schmelzkurvenanalyse	- 44 -
4.6.7	Referenzgenanalyse	- 46 -
4.6.8	Normalisierung der Genexpressionsdaten	- 47 -
4.7	Statistische Auswertung	- 48 -
5	Ergebnisse	- 51 -
5.1	Referenzgenanalyse	- 51 -
5.2	<i>Microarray</i> Analyse	- 51 -
5.2.1	Venn-Diagramm-Analyse	- 51 -
5.2.2	Hierarchische Clusteranalyse	- 55 -
5.3	qRT-PCR Genexpressionsanalyse	- 59 -
5.3.1	Analyse aller miRNAs im <i>Dot-Density-Plot</i>	- 61 -
5.3.2	Deskriptive Analyse einzelner miRNAs im Punktediagramm	- 63 -
6	Diskussion	- 66 -
7	Schlussfolgerungen	- 87 -
	Literatur- und Quellenverzeichnis	- 89 -
	Anhang	
	Lebenslauf	
	Danksagung	
	Ehrenwörtliche Erklärung	

1 Zusammenfassung

Der pro-inflammatorische Status älterer Menschen, auch als *Inflamm-Aging* bezeichnet, und die Immunoseneszenz scheinen eine wesentliche Ursache für die Dysregulation der Wirtsreaktion auf Infektionen im Alter zu sein. Die ohnehin hohe Mortalität der Sepsis steigt ab dem 60. Lebensjahr linear an. Dessen ungeachtet wird die große Mehrheit der tierexperimentellen Untersuchungen immer noch an jungen Versuchstieren durchgeführt. Mit der Entdeckung der miRNA eröffneten sich neue Möglichkeiten der Genregulation. Veröffentlichungen bezüglich des Einflusses der miRNAs auf die Sepsis sind rar und Daten über die Veränderungen des miRNA-Profiles während einer Sepsis im Alter existieren bisher nicht.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, das murine miRNA-Genexpressionsprofil in zirkulierenden Leukozyten nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis zu untersuchen. Erwartet wird eine signifikante Änderung des murinen miRNA-Genexpressionsprofils mit zunehmendem Alter nach Sepsisinduktion. Damit soll die Bedeutung muriner Alterungsmodelle in der Sepsisforschung dokumentiert und diskutiert werden. Zusätzlich werden zehn sepsisrelevante miRNAs selektiert und einer qRT-PCR unterzogen. Sie sollen zur Bestätigung der Ergebnisse dienen und sind mit spezifischen Funktionen in zirkulierenden Leukozyten belegt.

Die vorliegende randomisierte kontrollierte tierexperimentelle Studie arbeitet mit 24 Mäusen einer Interventionsgruppe und 12 Mäusen einer Kontrollgruppe. Beide Gruppen wurden in drei Altersstufen von 4, 12 und 24 Monate alten Mäusen unterteilt. Den Mäusen der Interventionsgruppe wurde eine polymikrobielle Sepsis durch die intra-abdominelle Injektion einer Faeces-Suspension induziert, den Mäusen der scheinoperierten Gruppe wurde hingegen lediglich eine Kochsalzlösung injiziert. In beiden Fällen wurde nach dem Protokoll des PCI-Modells verfahren. Das leukozytäre miRNA-Profil wurde mit Hilfe der *Microarray* Genexpressionsanalyse bestimmt. Zur Validierung der Ergebnisse wurden in einem zweiten Schritt zehn sepsisrelevante miRNAs in einer qRT-PCR untersucht.

Die Auswertung der Daten des *Microarray* Versuchs lässt deutliche Unterschiede im Genexpressionsmuster der miRNAs zwischen den verschiedenen Gruppen

erkennen. Die gerade geschlechtsreifen Mäuse reagieren auf die Sepsisinduktion mit einer signifikanten miRNA-Genexpressionsänderung, während sich das miRNA-Profil der adulten und der senilen Mäuse nur in sehr begrenztem Umfang verändert. Zwischen den beiden letztgenannten Gruppen besteht nur ein geringer Unterschied in der miRNA-Genexpression. Auch in der *Sham*-Gruppe verändert sich physiologisch das miRNA-Genexpressionsmuster signifikant mit dem Alter. Wiederum bestehen zwischen den adulten und den senilen Mäusen nur geringe Unterschiede, während sich die gerade geschlechtsreifen Mäuse deutlich abheben.

Die qRT-PCR bestätigt diese Ergebnisse. Die gerade geschlechtsreifen Mäuse reagieren auf Sepsis mit erhöhter Transkription der zehn sepsisrelevanten miRNAs. Mit zunehmendem Alter wird das Reaktionsniveau deutlich schwächer. Die miRNA-Transkription der senilen PCI Mäuse ändert sich gegenüber ihrer gleichaltrigen Kontrollgruppe nicht relevant. Vier der selektierten miRNAs (miR-148, miR-181d, miR-182 und miR-106a) wurden relevant differenziert exprimiert und sollten Gegenstand weiterführender Studien sein.

Ziel der tierexperimentellen Forschung im Bereich der Humanmedizin ist und bleibt die Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung belegen eindeutig, dass in der tierexperimentellen Sepsisforschung Alterungsmodelle unbedingt Beachtung finden müssen. Gerade die Sepsis betrifft vorwiegend den alten Patienten. Das Immunsystem sowie die Wirtsreaktion auf Infektionen sind im Alter wesentlichen Veränderungen unterworfen. Dies trifft auch auf Mäuse zu. Bei der Übertragung der Forschungsergebnisse muriner Sepsismodelle an jungen Tieren auf den alternden Patienten ist nur bedingt möglich. In zukünftigen Untersuchungen sollten diesbezüglich vermehrt gealterte Versuchstiere verwendet werden.

Für die Entwicklung erfolgreicher Sepsistherapien besitzen die miRNAs ein großes Potential. Zahlreiche Studien dokumentieren ihre Funktion im Immunsystem und im Alterungsprozess. Auch bezüglich der Sepsis unterliegen die miRNAs einer altersabhängigen Regulation und müssen deshalb altersbedingt differenziert betrachtet werden.

2 Einleitung

Das Krankheitsbild der Sepsis ist eine große Herausforderung in der modernen Intensivmedizin und Gegenstand unzähliger Forschungsvorhaben. Der Begriff selbst leitet sich von dem griechischen *σηπω* ("faul machen") ab und wurde von Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) eingeführt. Mit dem Wort „Fäulnis“ beschrieb er trotz des damals noch fehlenden pathophysiologischen Wissens treffend das Endstadium dieser, durch „Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ (Bone 1989) verursachten Krankheit. Erst nachdem Robert Koch (1843-1910) Bakterien als Krankheitserreger erkannte und Schottmüller 1914 deren Toxinwirkung nachgewiesen hatte, kam man der von Roger C. Bone postulierten und heute noch gültigen Ätiologie näher (Deutsche Sepsis-Gesellschaft).

Sepsis ist eine komplexe systemische inflammatorische Wirtsreaktion auf eine Infektion. Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock definieren ein Krankheitskontinuum, in dem die primär sinnvolle Abwehrreaktion des Immunsystems außer Kontrolle der physiologischen Inhibitormechanismen („*host defense failure*“) gerät. In unkontrollierter, überschießender und generalisierter Form werden nicht mehr nur die auslösenden pathogenen Noxen eliminiert, sondern zusätzlich autodestruktive Schädigungen körpereigener Zellsysteme und Organe verursacht (Hotchkiss und Karl 2003, Gustot 2011).

Der Krankheitsverlauf der Sepsis wird primär durch den Ablauf sowie das Ausmaß der Wirtsreaktion auf die auslösende Noxe und weniger durch die Art, die Zahl, die Pathogenität oder die Virulenz der Erreger bestimmt (van Deventer und Pajkrt 1997). Die Pathogene gramnegativer aber auch grampositiver Bakterien binden unter anderem an membranständige CD14-Rezeptoren, die sich vor allem auf der Oberfläche von Makrophagen und Monozyten befinden (Pugin et al. 1994, Wright et al. 1990). CD14 aktiviert über die Familie der Toll-like Rezeptoren letztlich eine Reihe immunkompetenter Zellen (Vasselon und Detmers 2002). Diese schütten die primären Inflammediatoren TNF- α und IL-1 aus, die durch eine Vielzahl von

sekundären Mediatoren wie Stickstoffmonoxid, Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels oder Sauerstoffradikale verstärkt werden.

Stimuliert durch die Mediatoren exprimieren Endothelzellen Adhäsionsfaktoren für Leukozyten. Durch diesen Kontakt werden die Leukozyten aktiviert, setzen zytotoxische Substanzen frei und schädigen damit nicht nur die Infektionserreger, sondern auch Endothelzellen (Cohen et al. 2002). Es kommt zu Mikrozirkulationsstörungen und Kapillarlecks, was den Austritt von intravasaler Flüssigkeit erlaubt. Zusätzlich stimulieren die Inflammediatoren die endotheliale NO-Synthetase. NO führt zur Gefäßdilatation mit folgender Hypotension (Landry und Oliver 2001). Die Hemmung physiologischer Antikoagulantien und die Aktivierung des Gerinnungssystems mündet in einer disseminierten Gerinnung (ten Cate et al. 2001). All diese Mechanismen führen letztlich zu einer ausgeprägten kardiozirkulatorischen Störung, die auch die Organperfusion betrifft und die Entstehung eines Multiorgandysfunktionssyndroms (MODS) begünstigt. Das MODS wiederum gilt als die häufigste Todesursache bei der Sepsis (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.).

Während lange die Bakteriämie als *conditio sine qua non* der Sepsisdiagnose galt, ist nach heutigem Verständnis das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion des Wirtsorganismus auf einen mikrobiologischen Stimulus ausschlaggebend für die Diagnose der Sepsis. Über die Kombination aus Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten und Organfunktionen wird das Kontinuum der Sepsis definiert. Darunter fallen die akute Enzephalitis, die Thrombozytopenie, eine arterielle Hypoxämie, die arterielle Hypotonie, eine renale Dysfunktion und eine metabolische Azidose (Engel et al. 2007).

Sekundäre Peritonitis als Sepsisursache

Die Peritonitis wird definiert als Inflammation des Peritoneums, das die normalerweise sterile Bauchhöhle auskleidet. Eine intra-abdominelle Sepsis entsteht durch die Inflammation des Peritoneums durch pathogene Mikroorganismen und deren Toxine (Pavlidis 2003, Calandra und Cohen 2005). Die Ätiologie der sekundären Peritonitis umfasst die perforierten gastroduodenalen Ulzera, die

perforierten Appendizites, die Dünndarmstrangulationen, die Perforationen des Kolons (Divertikulitis, Volvulus), das karzinomatöse Geschehen, traumatische Bauchraumverletzungen und iatrogen nach chirurgischer Intervention (Marshall 2004). Infolge der Perforation eines intra-abdominellen Organs kommt es zur Kontamination des Peritoneums mit infektiösem Darminhalt. Während im oberen Gastrointestinaltrakt gram-positive Bakterien überwiegen, finden sich im unteren Gastrointestinaltrakt hauptsächlich gram-negative Bakterien sowie Anaerobier (Brun-Buisson 2000). Perforationen führen zur Freisetzung einiger hunderter Bakterienspezies und Pilzen. Obwohl die meisten Spezies vom wirtseigenen Abwehrsystem eliminiert werden, ist die resultierende Peritonitis fast immer polymikrobiell, bestehend aus aeroben und anaeroben Bakterien mit prädominant gram-negativen Organismen (Daley 2011).

Die Tabelle 1 listet die häufigsten, bei sekundärer Peritonitis gefundenen Bakterienspezies auf (Adler und Gasbarra 2005). Die am häufigsten gefundenen Bakterienspezies decken sich mit denen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena ermittelten Bakterienspezies aus dem gepoolten Stuhlgemisch, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Tab. 3 und 4, Abschnitt 4.2.2).

Gruppe	Bakterienspezies	Prozentanteil
Aerobier	Gram negativ	
	Escherichia coli	60%
	Enterobacter/Klebsiella	26%
	Proteus	22%
	Pseudomonas	8%
	Gram positiv	
	Streptokokken	28%
Anaerobier	Enterokokken	17%
	Staphylokokken	7%
	Bacteroides	72%
	Clostriden	17%
Pilze	Peptostreptokokken	14%
	Peptokokken	11%
	Candida	2%

Tab. 1: Prozentuale Häufigkeit der Bakterienspezies bei sekundärer Peritonitis. Nach Adler und Gasbarra (2005)

Sepsis im Alter

Sepsis ist eine Krankheit, die alle Altersklassen betrifft, ihren Häufigkeitsgipfel aber zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr erreicht (Eykyn et al. 1990). Die Hospitalisationsrate aufgrund von Sepsis nimmt exponentiell mit dem Alter zu (Dombrovskiy et al. 2007, Martin et al. 2006). Fortgeschrittenes Alter ist ein unabhängiger Risikofaktor für nosokomiale Infektionen und schwere Sepsis (Pittet und Wenzel 1995, Kale et al. 2011). Eine der Ursachen dafür ist in der, die Sepsis begünstigenden Multimorbidität ältere Patienten zu sehen. Maligne Tumore, Diabetes Mellitus Typ II, chronisches Leberversagen und chronisches Nierenversagen sind die wichtigsten prädisponierenden Krankheiten für eine Sepsis (Geerdes et al. 1992, Uzun et al. 1992). Mit dem Fortschreiten der Transplantationsmedizin und den modernen Therapieoptionen bei hämato-onkologischen Patienten gewinnen auch die immunsuppressiven Therapiestrategien immer mehr an Bedeutung. Darüber hinaus erhöhen die häufigere Nutzung invasiver Maßnahmen und die Verwendung körperfremder

Materialien wie zentralvenöse Katheder, Blasenkatheder *et cetera* bei älteren Patienten das Risiko, an einer Sepsis zu erkranken (Sogaard et al. 2008). Dies führt unter anderem dazu, dass die Mortalität der Sepsis bei Patienten, die älter als 60 Jahre sind, linear ansteigt (Haug et al. 1994, Angus et al. 2001, Abb. 1).

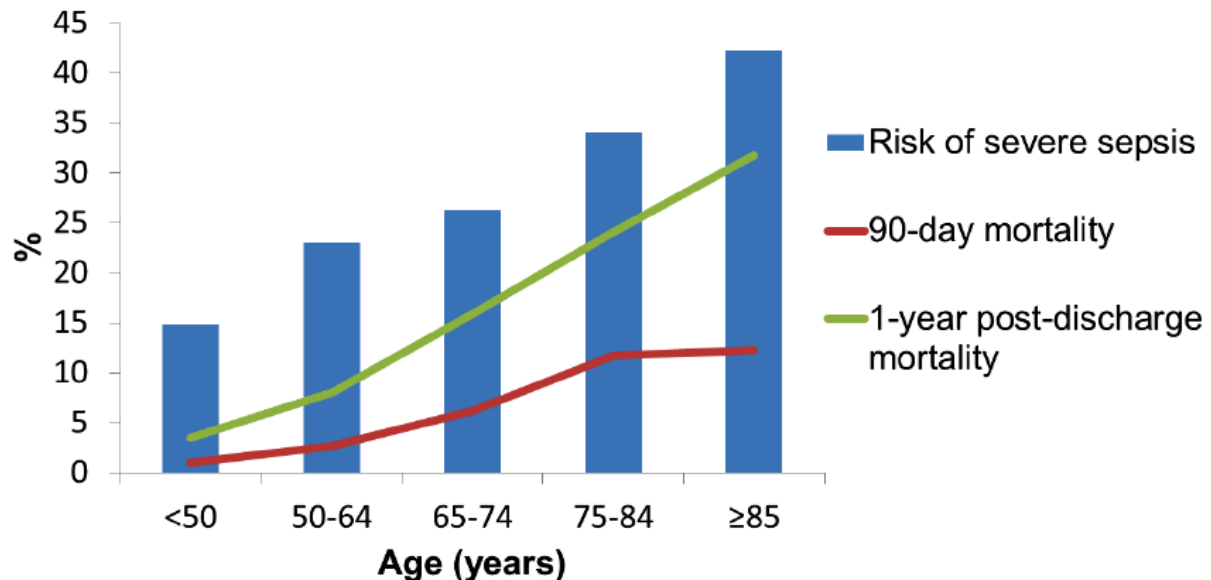


Abb. 1: Altersabhängiges Risiko von schwerer Sepsis und Mortalität einer prospektiven Kohortenstudie von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie. 90-Tage Mortalität wurde ab dem ersten Tag der Hospitalisation gemessen, 1-Jahres-Mortalität ab dem Tag der Krankenhausentlassung. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg aller Werte mit steigendem Alter ($p < 0,001$; nach Kale und Yende 2011).

Der normale Alterungsprozess ist assoziiert mit der Dysregulation des Immunsystems und wird in der Wissenschaft als „*Immunosenescence*“ beschrieben. Die Immunoseneszenz wird charakterisiert durch eine Abnahme der zellulären und humoral vermittelten Immunantwort (Weiskopf et al. 2009). Diese Veränderungen tragen zu einer Dysregulation der Wirtsreaktion auf Infektionen im Alter bei (Ademokun et al. 2010). Es kommt zu einer Verminderung der Lymphozytendifferenzierung und zu einem *Shift* von der Lymphopoese zur Myelopoese (Frasca et al. 2008, Geiger und Rudolph 2009).

Dass die Inflammation ein wesentlicher Faktor altersabhängiger Krankheiten darstellt, ist weitgehend akzeptiert. In epidemiologischen und tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass ein erhöhter Status inflammatorischer Mediatoren das Risiko für eine schwere Sepsis und ihre Mortalität erhöht (Remick

et al. 2002, Walley et al. 1996, Damas et al. 1992). Franceschi et al. (2000) konnten zeigen, dass bei älteren Menschen NF- κ B regulierte inflammatorische Marker wie IL6, TNF- α , IL1b und CRP chronisch erhöht sind, ohne dass eine infektiöse Krankheit zugrunde liegt. Das führt zu einer persistierend hohen Aktivität der B- und T-Lymphozyten und zur Verminderung ihres Replikationspotentials (Vallejo et al. 2004). Dieser pro-inflammatorische Status wird auch als „*Inflamm-Aging*“ bezeichnet (Franceschi et al. 2000). Ein permanent geringfügig aktiviertes Immunsystem schädigt Zellen und Gewebe mit der Folge, dass Arteriosklerose, Arthritis, Diabetes Mellitus und andere altersabhängige Erkrankungen auftreten (Jiang et al. 2012). Immer noch kontrovers wird diskutiert, ob die erhöhten inflammatorischen Mediatoren die Ursache oder die Folge für altersabhängige Erkrankungen sind (Stanley 1996, Streat et al. 2000).

MiRNA scheinen eine wichtige Rolle in altersabhängigen Krankheiten und der Zellalterung zu spielen (Boehm und Slack 2005, Mudhasani et al. 2008, Poliseno et al. 2008, Bhaumik et al. 2009). In entsprechenden Experimenten wiesen alte Mäuse, denen durch CLP (*cecal ligation and puncture*) oder LPS- (Lipopolysaccharide) Inokulation eine Sepsis induziert wurde, eine stärkere inflammatorische Reaktion auf als junge Mäuse (Tateda et al. 1996, Turnbull et al. 2003, Saito et al. 2003). Altersabhängige Mausmodelle konnten außerdem zeigen, dass die Sensitivität gegenüber der Sepsisinduktion bei älteren Mäusen erhöht ist und darauf folgend auch ihre Mortalität (Hyde et al. 1990, Wichterman et al. 1980).

Trotz dieser Kenntnisse werden nahezu alle experimentellen Studien an jungen Mäusen (6 bis 16 Wochen) durchgeführt. Dies entspricht einem menschlichen Alter zwischen 10 und 17 Jahren (Abb. 2). Die Aussagekraft derartiger Experimente für das vorwiegend gealterte klinische Patientengut ist weitgehend unbekannt (Zurcher et al. 2001, Anderson 1999). Experimentelle Sepsismodelle am Menschen, beispielsweise die Injektion kleiner Mengen an LPS, können Aufschlüsse über die Wirtsreaktion des Menschen geben, werden aber aus Sicherheitsgründen nicht an älteren Probanden durchgeführt (Cohen 2002). Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchsgruppen von 4, 12, und 24 Monate alten Mäusen liefern daher ein geeignetes murines

Alterungsmodell und könnten die Lücke zu den fehlenden humanen Sepsismodellen am alten Menschen schließen. Sie versprechen eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den älteren Menschen (Turnbull et al. 2003).

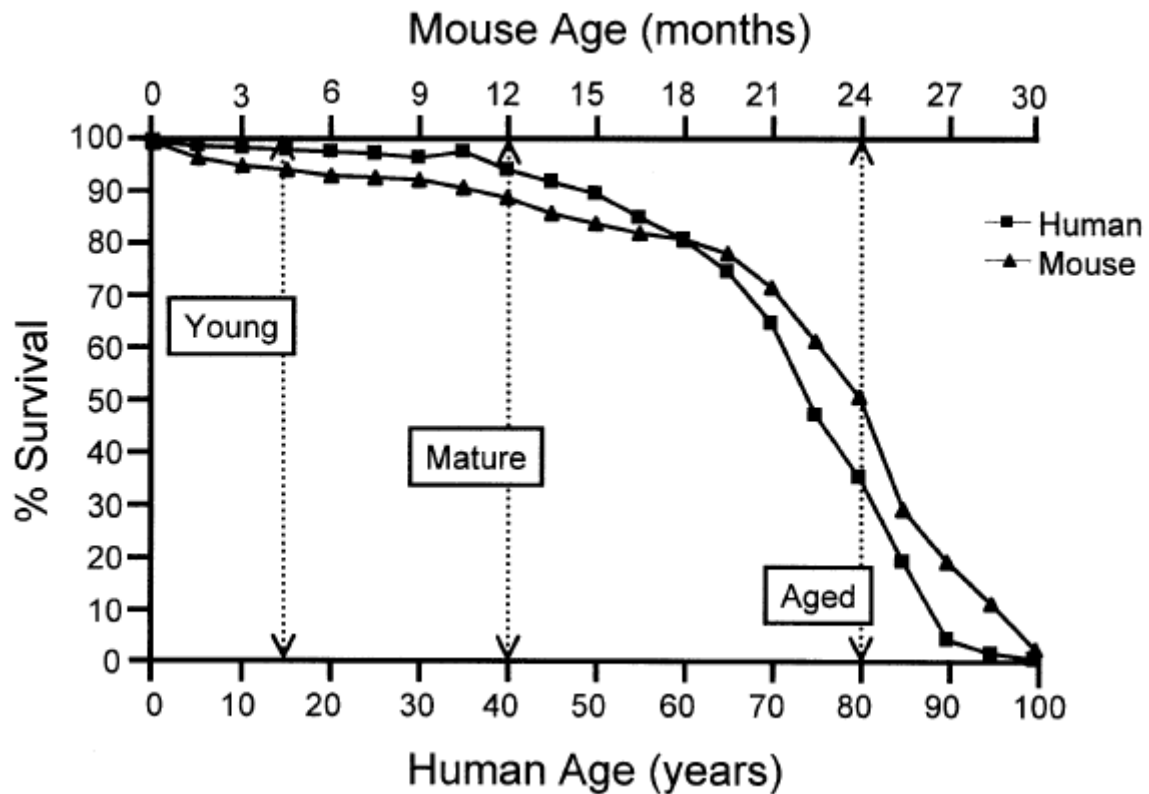


Abb. 2: Normale Überlebenskurve von Mäusen und Menschen. C57B/6 Labormäuse und Menschen haben eine parallel verlaufende Überlebenskurve. 4 Monate alte Mäuse entsprechen dem menschlichen Alter von 17 Jahren, 12 Monate 40 Jahren und 24 Monate 80 Jahren (nach Turnbull et al. 2003).

MicroRNA (miRNA)

Lange Zeit wurde postuliert, dass jedes Gen in ein Protein translatiert wird. Die Funktion der transkribierten RNA bestand also einzig aus der Übersetzung der DNA in Proteine. In den vergangenen zwei Jahrzehnten hat sich jedoch herausgestellt, dass es auch Gene gibt, die in nicht-kodierende, biologisch aktive RNA (*engl.: non-coding ribonucleic acid, ncRNA*) transkribiert werden. ncRNA-Moleküle, wie beispielsweise microRNA (miRNA), transferRNA (tRNA) oder Ribozyme, übernehmen dabei wichtige Funktionen bei der Genregulation, Replikation, Translation und dem Abbau von Molekülen. Die Summe aller transkribierten RNA-Moleküle in einer Zelle wird als Transkriptom bezeichnet.

Mit der neuen Klasse kleiner ncRNAs – der so genannten microRNAs – wurde ein bis dato völlig unbekannter Mechanismus zur Regulation der Genexpression entdeckt, der das Forschungsfeld der Genregulation in weiten Teilen revolutionierte. 1993 berichteten die Labore von Victor Ambros sowie von Gary Ruvkun parallel von einem kleinen, 21 Nukleotide langen RNA-Molekül in *C. elegans*, das nicht für ein Protein kodierte, sondern regulatorisch auf die Expression einer korrelierten mRNA wirkte (Lee et al. 1993, Wightman et al. 1993). Das als „miRNA-vermitteltes *Gensilencing*“ bezeichnete Phänomen wurde lange Zeit als ein für die Regulation der Gene von *C. elegans* spezifischer Mechanismus angesehen und blieb relativ unbeachtet. Reinhart et al. (2000) entdeckten bei *C. elegans* eine weitere miRNA, let-7. Erst als sich herausstellte, dass sowohl die Sequenz von miR-let-7 als auch die Sequenz der zugehörigen Bindestellen in der 3'UTR ihres Zielgens *lin-41* in verschiedenen Spezies konserviert vorliegen (Pasquinelli et al. 2000, Slack et al. 2000), wurde dieser biomolekulare Mechanismus als universell erkannt und seither intensiv beforscht. Inzwischen sind in der aktuellen Version der zentralen Datenbank für miRNA „*miRBase 19*“ über 25000 Gensequenzen aus 193 Spezies registriert. Derzeit wird postuliert, dass alleine im Menschen über 1600 verschiedene miRNAs für die Genregulation von ca. 30 Prozent der Gene verantwortlich sind (Lewis et al. 2005). Man geht davon aus, dass rund 3% aller Gene für miRNAs kodieren (Sen et al. 2009).

Inzwischen ist bekannt, dass miRNAs sehr wichtige Funktionen in grundlegenden zellulären Prozessen zukommen. Tierexperimente zeigten, dass miRNAs beispielsweise an der Koordination von Entwicklungsvorgängen, der Zelldifferenzierung, der Ausbildung des Immunsystems und der Wirtsreaktion auf Infektionen beteiligt sind (Bartel 2004, Sempere et al. 2004). In der Medizin gewannen die genregulatorischen Fähigkeiten von miRNAs unter anderem durch deren Rolle in der Tumorphathogenese an Bedeutung (Baltimore et al. 2008).

MiRNA Biogenese

Die jeweilige miRNA kann als eigenes Gen (monocistronisch) vorliegen oder in einem Cluster zusammen mit anderen miRNAs von einem gemeinsamen Promotor aus transkribiert werden (polycistronisch) oder in einem Intron eines

proteinkodierenden Gens, mit dem sie gemeinsam transkribiert wird, lokalisiert sein (intronisch, Filipowicz et al. 2008). In den ersten beiden Fällen entsteht durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) ein typisches RNA-Pol II Transkript mit 5'-terminaler 7-Methylguanosin Kappe und 3'-terminalem Poly-A Schwanz (Lee et al. 2004, Borchert et al. 2006). Dieses, bis zu mehreren Kilobasen lange, primäre Transkript (pri-miRNA) faltet sich in Haarnadelstrukturen und enthält die späteren miRNAs als imperfekte „stem-loop“ Strukturen (Abb. 3). Diese stem-loop Strukturen werden bei der Prozessierung der pri-miRNA durch den Mikroprozessorkomplex, der aus dem Enzym Drosha (eine Endonuklease vom RNase III Typ) und seinem Cofaktor DGCR8 (*DiGeorge syndrom critical region on chromosome 8*) besteht, ausgeschnitten. Sie liegen dann als ca. 60 bis 80 Basenpaare lange Haarnadel-Strukturen vor, die als pre-miRNAs bezeichnet werden (Bushati et al. 2007, Rana 2007, Du und Zamore 2005). Im Anschluss wird die pre-miRNA mittels des Ran-GTP (Ran-Guanin Triphosphatase) abhängigen Nuklear-Export-Faktors Exportin5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma der Zelle transportiert. Dort entsteht durch Spaltung mittels eines weiteren RNase III Enzyms namens Dicer im Komplex mit seinem Cofaktor TRBP (*TAR RNA binding protein*) ein ca. 18 bis 24 Nukleotide langes doppelsträngiges RNA Molekül. Das RNA-Duplex wird anschließend durch das Enzym Helikase aufgewunden. Im Allgemeinen bleibt der Strang, dessen 5'-Terminus am thermodynamisch instabileren Ende des RNA-Doppelstranges liegt, als reife miRNA erhalten (*guide strand*), während sein Gegenstrang (*passenger strand*) degradiert wird. Die reife miRNA wird in einen als miRNP (micro-Ribonucleoprotein) oder RISC (*RNA induced silencing complex*) bezeichneten Enzymkomplex inkorporiert, dessen Hauptkomponenten Proteine der Argonaut-(AGO) Familie sind (miRNA miRNP Komplex). Diese sind in der Lage, die endonukleolytische Spaltung oder die Hemmung der Translation der mRNA zu vermitteln (Peters und Meister 2007, Sontheimer und Carthew 2005). Argonaute sind die wichtigsten und auch die bisher bestcharakterisierten Bestandteile des miRNP Komplexes (Peters und Meister 2007, Tolia und Joshua-Tor 2007). Säugetiere besitzen vier AGO Proteine (AGO1 bis AGO4), wobei alle vier AGOs am miRNA vermittelten Gensilencing beteiligt sind.

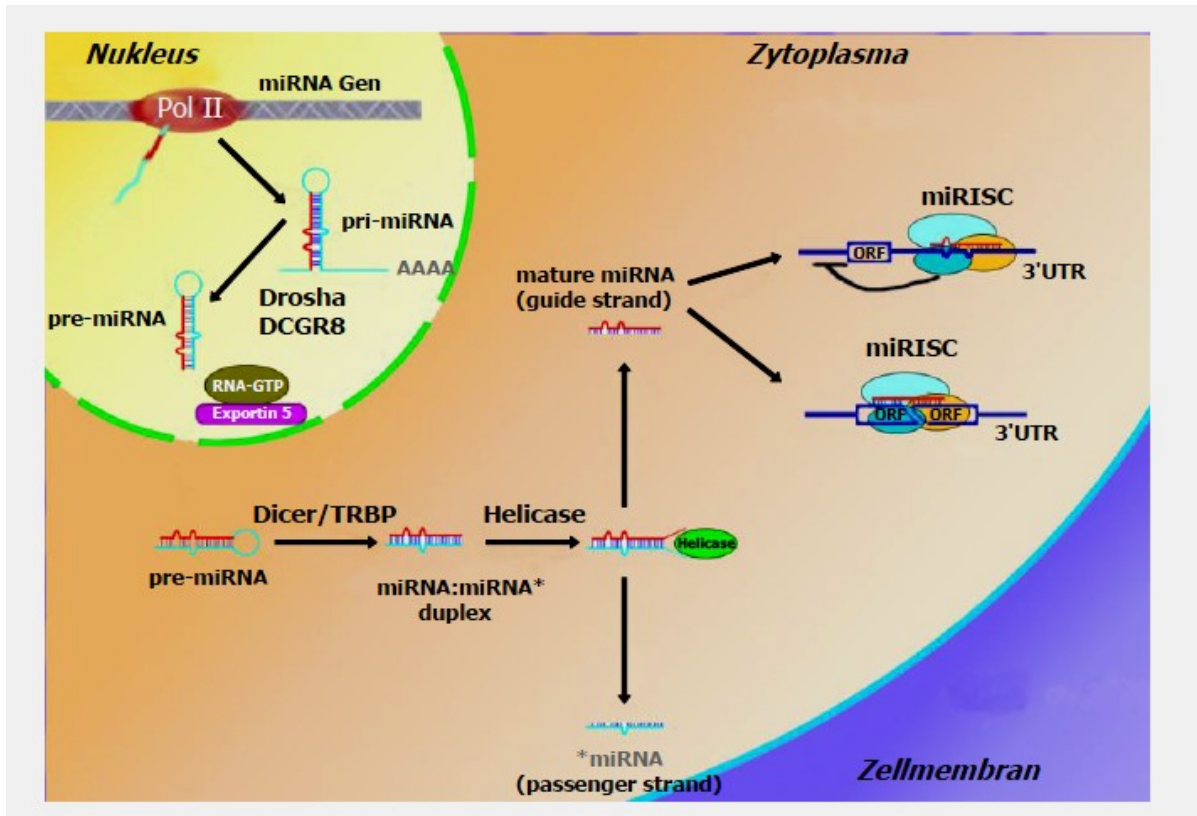
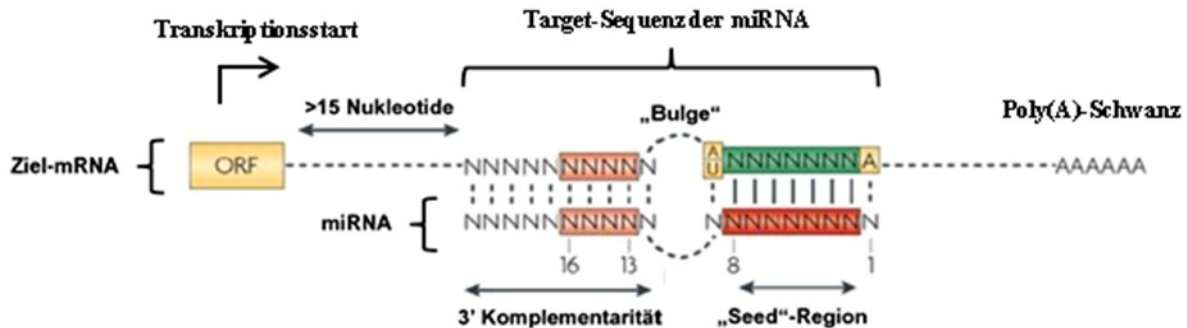


Abb. 3: Biogenese und Funktionsweise von miRNAs. Schematische Darstellung (nach Liu et al. 2007, modifiziert)

Interaktion von miRNA und Zielgen-mRNA

Die Interaktion zwischen miRNA und Zielgen-mRNA basiert auf dem Prinzip der komplementären Basenpaarung, hauptsächlich am 3'-UTR der Ziel-mRNA. Drei Grundregeln wurden durch bioinformatische und experimentelle Ansätze definiert. Allerdings zeigen zahlreiche Ausnahmen, dass diese wohl noch unvollständig verstanden sind. Die erste Voraussetzung ist eine perfekte Komplementarität beider RNA Stränge innerhalb der „seed“-Sequenz (2-8 Nukleotide am 5'-Terminus der miRNA und entsprechend die Target-Sequenz am 3'-UTR der Ziel-mRNA, Abb. 4).

Die zweite Voraussetzung ist die Bildung einer „Blase“ (*Bulge*) in der zentralen Region des miRNA-mRNA Duplex aufgrund diverser *mismatches*. Hierdurch wird vermutlich die AGO-vermittelte endonukleolytische Spaltung der mRNA ermöglicht. Als dritte Voraussetzung benötigt die Interaktion ein ausreichendes Maß an Komplementarität der Target-mRNA gegenüber dem 3'-Ende der miRNA,



Weitere, hier nicht aufgeführte Faktoren, die die Stabilität und damit die Effizienz der Bindung beeinflussen, sind bekannt. Zusätzlich konnten, wie oben angesprochen, Ausnahmen nachgewiesen werden, die den Grundregeln widersprechen. So kann unter Umständen sogar eine Blase in der *seed*-Region für die Interaktion notwendig sein (Vella et al. 2004, Reinhart et al. 2000). Auch weiß man inzwischen, dass eine miRNA mit dem offenen Leserahmen und der 5'-UTR der mRNA interagieren kann (Lytle et al. 2007, Tay et al. 2008). Die ausgeprägte Variabilität bei der Basenpaarung ist auch eine der Ursachen für die vielfältigen Funktionen der miRNA. Eine einzige miRNA ist in der Lage dutzende bis hunderte Ziel-mRNA zu regulieren (Lim et al. 2005, Hendrickson et al. 2009). Oft liegen die *Target*-Sequenzen der Ziel-mRNA in mehreren Kopien vor oder es existieren Bindestellen für unterschiedliche miRNA an einer Ziel-mRNA. Diese sogenannten *Target Hubs* können kooperativ wirken und auf diese Weise den reprimierenden Effekt orchestrieren (Doench und Sharp 2004, Grimson et al. 2007).

Obwohl bekannt ist, dass miRNAs auch eine Translations-Aktivierung induzieren können (Henke et al. 2008, Vasudevan und Steitz 2007), liegt der Schwerpunkt der Forschung weitestgehend auf ihrer Funktion als Translations-Repressoren. Deshalb

sollen im Folgenden die bisherigen Erkenntnisse auf diesem Themengebiet zusammenfassend dargestellt werden.

In vielen Fällen beruht die durch miRNA vermittelte Repression einer mRNA auf deren Destabilisierung (Wu et al. 2006, Bagga et al. 2005, Behm-Ansmant et al. 2006 (1)). Darüber hinaus kann auch eine Inhibierung der Translation erfolgen, wobei diese auf der Ebene der Initiation oder der Elongation stattfinden kann. Beginnend mit einer graduellen Verkürzung des 3'-Poly-A Schwanzes wird die mRNA in Eukaryoten auf zwei verschiedenen Wegen abgebaut. Entweder kann der RNA-Strang einerseits weiter progressiv in 3' → 5' Richtung exonukleolytisch abgebaut werden oder es erfolgt andererseits ein als *Decapping* bezeichnetes Entfernen der 5'-terminalen 7-Methylguanosin Kappe mit exonukleolytischem Abbau in 5' → 3' Richtung (Parker und Song 2004). Es wird vermutet, dass zumindest die finalen Schritte des mRNA Abbaus in beiden Fällen in den sogenannten *P-bodies* stattfinden. Dies sind zelluläre Strukturen, die mRNA katabolisierende Enzyme und translationale Inhibitoren in hoher Konzentration enthalten (Eulalio et al. 2007, Parker und Sheth 2007). Die AGO Domäne des miRNA-miRNP Komplexes führt zur Speicherung der reprimierten mRNA in diesen *P-bodies* und beeinflusst ausschlaggebend deren Funktion sowie den mRNA Abbau (Behm-Ansmant et al. 2006 (2)).

Wie oben beschrieben kann die Expressionsinhibition der mRNA auch ohne den Abbau der mRNA erfolgen. Der miRNA-miRNP Komplex blockiert dabei die Translation der mRNA ohne sie zu destabilisieren. Vermutlich findet diese Inhibition auf der Ebene der Translationsinitiation statt. Zur Initiation der Translation bindet die 5'-terminale 7-Methylguanosin Kappe der mRNA an den Multidomänenkomplex eIF4F. Experimentelle Ergebnisse konnten zeigen, dass Mitglieder der AGO Proteinfamilie an die 7-Methylguanosin Kappe binden und damit die Interaktion mit eIF4E kompetitiv hemmen. Ein effektiver Initiationskomplex kann nicht ausgebildet werden (Chekulaeva et al. 2006, Richter und Sonenberg 2005, Kiriakidou et al. 2007).

Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die Inhibierung der Translation auf der Initiationsebene der einzige Mechanismus ist. Sedimentierungsstudien konnten

zeigen, dass es vermutlich auch zu einer Verlangsamung der Elongation kommt. Der Mechanismus bleibt aber unklar. Möglich ist, dass die Elongationsverlangsamung ein zusätzlicher, verstärkender Mechanismus ist, falls die Hemmung des Initiationsschrittes fehlschlägt (Filipowicz et al. 2008). Warum einige mRNA durch Destabilisierung und andere durch Translationsinhibition oder durch Kombination beider Effekte reprimiert werden, ist nicht geklärt. Vermutlich spielen akzessorische, an die 3'-UTR gebundene Proteine und zentrale Abschnitte des miRNA-mRNA Duplex eine Rolle.

Bedeutung in der Medizin

Durch weitere Erkenntnisse über die Wirkmechanismen der miRNA erhofft man sich neue diagnostische und therapeutische Ansätze für schwer heilbare oder nur palliativ behandelbare Krankheiten zu entwickeln (Barbarotto et al. 2008, Fiore et al. 2008). Von besonderem Interesse in der miRNA-Forschung ist dabei naturgemäß die Tumorphathogenese. In Studien konnten unter anderem miRNA-Veränderungen nachgewiesen werden, die mit dem Vorliegen einer malignen Transformation des Gewebes oder sogar mit deren Prognose korrelieren (Lu et al. 2005, Schetter et al. 2008). Unter anderem wiesen Schetter et al. (2008) nach, dass das Expressionsmuster von 37 miRNAs beim Kolon-Karzinom nicht nur maligne veränderte Mukosa sicher identifiziert, sondern auch mit der 5-Jahres-Überlebensrate korreliert. In den letzten Jahren hat sich die miRNA-Forschung auch auf viele weitere Gebiete der Medizin ausgedehnt. Die Rolle der miRNAs bei *Remodeling*-Prozessen des Herzens und als Biomarker zur Myokardinfarktdiagnostik wird intensiv beforscht (Divakaran und Mann 2008). So kann beispielsweise miR-449-5p als Biomarker bei einem akuten Herzinfarkt verwendet werden (D'Alessandra et al. 2010). MiR-122 ist leberspezifisch (Niepmann 2009, Kutay et al. 2006). MiR-216 ist ein Indikator für Pankreasschäden (Kong et al. 2010). Gilad et al. (2008) demonstrierten, dass plazentare miRNA-Level zwischen Schwangerschaft und keiner Schwangerschaft unterscheiden können. Ebenso scheinen virale miRNAs die Genexpression des Wirts zum Vorteil des Virus zu beeinflussen. Beschrieben wurde dies beim Herpes-, HI- und Epstein-Barr-Virus (Grassmann und Jeang 2008). Spezifische miRNA Genexpressionen konnte auch in weiteren Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis (Pauley et al. 2008), Diabetes

Mellitus Typ II (Tang et al. 2008) und muskulären Erkrankungen (Chen et al. 2009) nachgewiesen werden. Der Alterungsprozess und die chronische Inflammation sind beides eng miteinander verbundene Prozesse. Schroen und Heymans (2011) erstellten eine Übersicht aller bisher bekannter miRNAs, die in altersabhängigen, chronisch inflammatorischen Krankheiten involviert sind oder als deren Biomarker dienen könnten (Abb. 5).

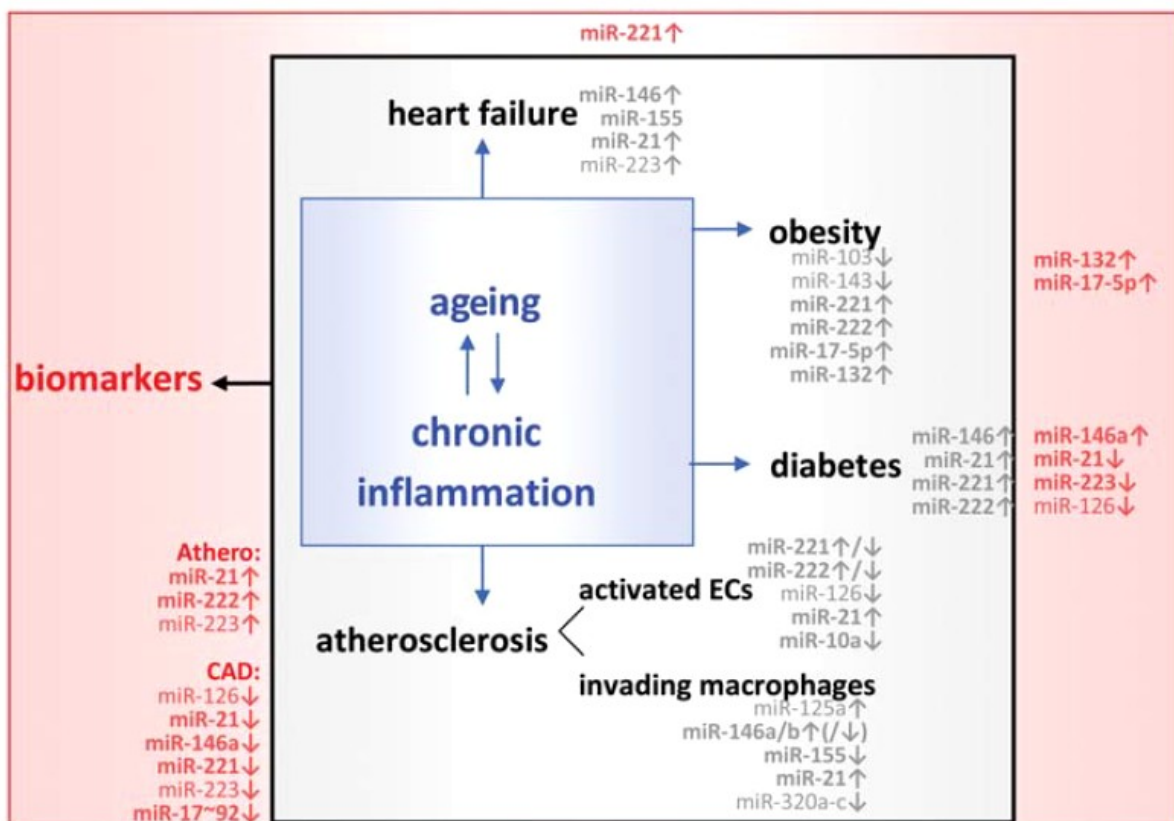


Abb. 5: MiRNAs in Alterung und Inflammation. Übersicht über die Expressionsänderung verschiedener miRNAs in altersabhängigen, chronisch inflammatorischen Krankheiten nach Schroen und Heymans (2011). Zusätzlich können miRNAs als zukünftige Biomarker dieser Krankheiten dienen. CAD = Coronary Arterie Disease, ECs = Endothel Cells.

Obwohl viele Studien darauf hinweisen, dass miRNAs für die korrekte Funktion und Entwicklung des Immunsystems eine tragende Rolle spielen, ist die Funktion der miRNA bei Erkrankungen, die mit einer Dysregulation des Immunsystems einhergehen, wie beispielsweise der überschießenden Wirtsreaktion auf eine Sepsis, weitgehend unbekannt. Taganov et al. (2006) brachten die miRNAs als Mediatoren des angeborenen Immunsystems mit der Identifikation der miR-146a als negativen Feedback-Regulator des Toll-like Rezeptors ins Spiel. Sheedy und O'Neill (2008)

erforschten ebenfalls die Rolle der miRNAs als mögliche Mediatoren einer Inflammation. Bhaumik et al. (2009) konnten zeigen, dass miRNAs die altersabhängigen Inflammation limitieren können. Die miR-146a und miR-146b Level sind in gealterten Fibroblasten erhöht und inhibieren eine exzessive Sekretion der inflammatorischen Zytokine IL-5 und IL-8 (Bhaumik et al. 2009). Seit dem folgte eine Reihe weiterer Studien, die die Funktion einzelnen miRNAs in der Regulation des Immunsystems untersuchten. Eine erste Arbeit, die sich mit dem Thema der miRNA-Regulation bei septischen Patienten beschäftigt, wurde im Jahre 2009 von Vasilescu et al. publiziert. Sie konnten vier differentiell exprimierte miRNAs in Leukozyten septischer Patienten im Vergleich zu nicht-septischen Patienten identifizieren. Zusätzlich beschrieben die Autoren eine inverse Korrelation zwischen dem Plasmaspiegel dieser spezifischen miRNAs und den drei Sepsis relevanten Markern IL-18, IL-10 und TNF- α (Vasilescu et al. 2009). Seit dem fokussiert sich die Forschung besonders auf die Verwendung der miRNAs als mögliche Biomarker der Sepsis.

Die frühe Diagnose der Sepsis ist essentiell für eine erfolgreiche Therapie. Bisher sind Blutkulturen der Goldstandard, um die Sepsis von anderen, nicht-infektiösen Inflammationszuständen zu unterscheiden. Oft vergehen jedoch Tage, bis die Ergebnisse der Blutkultur vorliegen. Bei der Sepsis hängt der Erfolg der Therapie aber von ihrem frühzeitigen Einsatz ab (Young 1990). Gegenwärtig ist Procalcitonin der viel versprechendste Biomarker für die Sepsis und wird als diagnostisches Kriterium in der Klinik verwendet (Levy et al. 2003). Allerdings kann Procalcitonin nicht zuverlässig zwischen einer Sepsis und anderen inflammatorischen Ursachen wie Polytraumata, postoperative Traumata oder beispielsweise einer Pankreatitis unterscheiden (Tang et al 2007, Pugin 2002). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, nach neuen Biomarkern für die Identifikation der Sepsis zu suchen, die auch eine Differenzierung zwischen dem SIRS und der Sepsis und ihren verschiedenen Schweregraden ermöglichen.

MiRNA besitzen ein großes Potenzial als zukünftige Biomarker für verschiedene Krankheiten und deren Schweregrade (Chen et al. 2008). Entgegen früherer Vermutungen, dass die RNA im Blut sehr schnell durch RNasen degradiert wird,

weis man heute, dass die Halbwertszeit von miRNAs in Zellen oder Organen mehrere Stunden bis hin zu einigen Tagen betragen kann (Gatfield et al. 2009, Großhans and Chatterjee 2010). Chen et al. (2008) zeigten, dass das Serum eine große Anzahl von miRNAs enthält und ihre Anzahl auch nach längerem Lagern, bei variablem pH, nach mehrfachem Auftauen oder sogar bei Erhitzung bis 100 °C relativ konstant bleibt. MiRNAs können darüber hinaus noch in anderen Körperflüssigkeiten wie Plasma, Speichel, Urin, Amnionflüssigkeit und Muttermilch vorkommen (Chen et al. 2012, Pant et al. 2012), wo sie vor RNasen geschützt, in Mikrovesikeln oder Exosomen zirkulieren (Viaud et al. 2008).

Bisher wurden sechs miRNAs als mögliche Biomarker der Sepsis identifiziert. Die miR-150 war während einer Sepsis reduziert und korrelierte mit dem *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score* (Vasilescu et al. 2009). Die Level der zirkulierenden miRNAs miR-146a und miR-223 waren bei septischen Patienten ebenfalls reduziert (Wang JF et al. 2010). MiR-223 und die, von der Arbeitsgruppe um HJ Wang identifizierten, miRNAs miR-15a und miR-16 konnte zwischen einer Sepsis und einem SIRS unterscheiden und wurde neben drei weiteren miRNAs (miR-499-5p, miR-122 und miR-193b) als mögliche Biomarker vorgeschlagen (Wang HJ et al. 2012 (1) und (2)). Diese Daten indizieren, dass bestimmte miRNAs nicht nur als Biomarker für die Sepsis dienen könnten, sondern auch zur Beurteilung von ihrem Schweregrad. Vorteilhaft ist auch, dass schon zwei Stunden nach Sepsisinduktion Änderungen im miRNA Genexpressionsmuster nachweisbar sind (Hsieh et al. 2012). Noch sind diesbezügliche Forschungen aber über ihr Anfangsstadium kaum hinausgekommen.

Intra-abdominelle Sepsismodelle

Tiermodelle bilden die Basis der Sepsisforschung. Die auf diese Weise gewonnenen Erkenntnisse können dann in begrenztem Maße auf den Menschen übertragen werden (Dyson und Singer 2009). Die geringen Kosten und die geringe Größe von Nagetieren machen sie zu geeigneten Modellen für präklinische Experimente und zur Erprobung von neuen Therapien. Eine große Anzahl an Tieren kann relativ schnell und reproduzierbar untersucht werden. Das Genom der Mäuse unterscheidet

sich nur um ca. 3% vom Genom der Menschen und erlaubt von daher durchaus Rückschlüsse auf den Menschen (Mural et al. 2002). Gemäß der Tierverwendungsstatistik des deutschen Verbraucherministeriums wurden 2009 über 1,8 Millionen Mäuse für Tierversuche eingesetzt, was 67% aller Versuchstiere entspricht. Damit sind sie die mit Abstand am häufigsten verwendeten Versuchstiere in Deutschland, was der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Forschungsgruppen sehr entgegenkommt. Ein weiterer Vorteil von Nagetieren und insbesondere Mäusen ist die Möglichkeit, Studien an genetisch modifizierten Tieren durch zu führen. Der Nachteil intra-abdomineller Sepsismodell an Nagetieren ist, dass therapeutische Maßnahmen, wie sie routinemäßig auf Intensivstationen durchgeführt werden, aufgrund der geringen Größe der Nagetiere nur in begrenztem Maße angewendet werden können und die Vorhersage der Effektivität neuer Therapien limitiert (Deitch 2005).

Da inzwischen eine Vielzahl an intra-abdominellen Sepsismodellen existiert, ist die Auswahl des richtigen Modells unbedingte Voraussetzung jeder experimentellen Studie. Die Untersucher sollten sich vorher bewusst sein, ob sie eine diffuse Peritonitis, intra-abdominelle Abszesse, einen septischen Schock oder ein MODS imitieren wollen. Soll ein präklinischer Test eines Wirkstoffes durchgeführt werden, muss die klinische Situation möglichst genau nachgebildet werden. Faktoren wie Geschlecht, Alter, Nebenerkrankungen *et cetera* müssen berücksichtigt werden. Hingegen kann die Homogenität der Versuchstiere in der Grundlagenforschung von immenser Bedeutung sein um Variationen auszuschließen. Nicht zuletzt muss das Modell einfach durchzuführen, standardisiert und reproduzierbar sein. Das „universelle“ Sepsismodell kann es somit nicht geben.

Zur Induktion einer intra-abdominellen Sepsis bei Nagetieren werden hauptsächlich vier verschiedene Modelle bzw. ihre Modifizierungen genutzt (Deitch 2005): (1) Lipopolysaccharid Modell (LPS-Modell), (2) Installation fäkaler Pellets, (3) Inokulation definierter Bakterien und (4) Kontaminationsmodelle mit endogener Faeces. Der Schweregrad der Sepsis wird je nach Mortalitätsrate als leicht, mittel oder schwer angegeben (Rittirsch 2009). (1) Das früher häufig angewandte LPS-

Modell gilt heute nicht mehr als ein valides Sepsismodell. Die Injektion einer großen Menge an LPS führt eher zu einem Endotoxin-Schock als zu einer polymikrobiellen Infektion (Cross et al. 1993). Die Vorteile seiner einfachen Handhabbarkeit und Reproduzierbarkeit können die Nachteile nicht aufwiegen. Studien zeigten, dass sich intra-abdominelle LPS-Modelle in wichtigen physiologischen Vorgängen von beispielsweise bakteriellen Modellen unterscheiden (Zanetti et al. 1992, Remick et al. 2000, Recknagel 2012). (2) Fäkale Pellets sind mit Faeces gefüllte *Fibrinclots* oder Gelatinekapseln. Dadurch wird die schnelle Abwehr der Bakterien verhindert und der Krankheitsprozess verlängert. Dieses Modell eignet sich somit gut für die Imitierung eines intra-abdominellen Abszesses (Weinstein et al. 1974, Bartlett et al. 1978). (3) Relativ häufig wird *E. coli* zur Inokulation definierter Bakterien verwendet. Diese Bolusinjektion einer großen Menge an infektiösen Organismen führt meist schnell zum Tod. Das Versuchstier ist nicht mehr in der Lage seine Abwehrmechanismen zu entfalten. Die Ursache der Sepsis bei Patienten ist jedoch meist ein endogener Fokus, der Bakterien intermittierend über einen langen Zeitraum freisetzt. Außerdem entspricht die Infektion mit nur einer einzigen Bakterienspezies nicht der Realität. Die Peritonitis bei Patienten ist meist ein polymikrobielles Geschehen (Daley 2011).

(4) Der Prototyp endogener Faeces-Modelle ist das *cecal ligation and puncture (CLP)*-Modell und seine Modifikationen wie *cecal ligation and incision (CLI)* oder *colon ascendens stent peritonitis (CASP)*. Sie zerstören die Integrität des Darms und kommen der durch Peritonitis induzierten Sepsis am Menschen am nächsten (Wichterman et al. 1980). Durch die Größe der Nadel, die Anzahl der Inzisionen oder die Dicke des Stents kann der Schweregrad der Sepsis moduliert werden. Ihr großer Nachteil ist die schwer zu kontrollierende Situation nach der Operation. Der Schweregrad der Peritonitis hängt von der Art und Menge des Darminhaltes, von der Bakterienzusammensetzung der Faeces und von der angewandten Operationstechnik ab (Hubbard et al. 2005). Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Studien. Trotzdem ist das CLP-Modell das am häufigsten genutzte intra-abdominelle Sepsismodell zur Erforschung der Pathophysiologie und Behandlung der Sepsis.

Da es sich bei dieser Untersuchung um Grundlagenforschung handelt, ist ein hohes Maß an Standardisierung von wesentlicher Bedeutung. Gonnert et al. stellten 2011 das *peritoneal contamination and infection (PCI)* Modell vor. Dabei wurde gepoolter Stuhl von gesunden Nicht-Vegetariern aufbereitet und mikrobiologisch untersucht. Anschließend wurden je 2 ml Aliquots bei -80°C gelagert. Auf diese Weise können hunderte von Experimenten mit derselben Stuhlprobe durchgeführt werden. Unter Narkose wurde den Versuchstieren die Stuhlsuspension intraperitoneal gespritzt (1,75 ml/kg KG). Diese einfache OP-Technik umgeht das Problem der operativen Inkonsistenz der CLP-, CLI- und CASP-Modelle (Gonnert et al. 2011). Die polymikrobielle Peritonitis führte zu einer schweren peritonealen Inflammation. Die systemischen Zytokine waren erhöht, die Blutgasanalysen wiesen eine respiratorisch kompensierte metabolische Azidose nach und Labormarker indizierten eine Multiorgandysfunktion. Ohne Antibiotikatherapie starben 29% der Mäuse in den ersten 15 h. Unter Antibiotika überlebten 50% der Mäuse die Sepsis. Dieses Modell bildet somit viele Merkmale humaner Sepsis ab. Da das infektiöse Material außerdem quantitativ und qualitativ definiert werden kann, sind die Versuche jederzeit leicht zu reproduzieren (Gonnert et al. 2011).

3 Ziele der Arbeit

Die Sepsis ist in erster Linie eine Krankheit des alten Menschen. Bis heute ist weitgehend unbekannt, auf welche Weise das Alter Einfluss auf den Verlauf der Sepsis nimmt. Die Diskussionen über die Ursachen der Fehlregulation des Immunsystems im Alter werden kontrovers geführt. Viele murine Sepsismodelle werden, möglicherweise auch aus ökonomischen Gründen, aber gerade an jungen Mäusen durchgeführt. Diese Versuchsanordnung nimmt wenig Bezug auf die vornehmlich betroffene Gruppe der älteren Sepsis-Patienten auf der ITS.

Die Entdeckung der miRNA eröffnete völlige neue Ansätze für Untersuchungen zur Genregulation. Ihre Rolle im Alterungsprozess und bei der Immunregulation wird intensiv beforscht. Hinsichtlich ihres Einflusses auf die Sepsis ist der Kenntnisstand allerdings gering. Über die Wirkungsweise der miRNAs während einer Sepsis im Alter existieren bisher noch keine Daten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das Genexpressionsmuster der miRNAs während einer Sepsis in einem murinen Alterungsmodell zu untersuchen.

Aufgestellt wurden folgende Arbeitshypothesen:

- Das murine miRNA-Genexpressionsmuster ändert sich mit dem Alter
- Die Induktion einer polymikrobiellen Sepsis führt zu einer Änderung des Genexpressionsmuster der miRNAs bei jungen Mäusen
- Bei senilen Mäusen fällt die Genexpressionsänderung der miRNAs deutlich schwächer aus
- Im Falle einer Sepsis werden bestimmte miRNAs differenziell exprimiert

Zur Überprüfung der Arbeitshypothesen wurde das miRNA-Genexpressionsmuster in zirkulierenden Leukozyten mithilfe der *Microarray* Technologie untersucht. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde anschließend eine qRT-PCR mit zehn selektieren miRNAs durchgeführt.

4 Methodik

4.1 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine randomisierte kontrollierte tierexperimentelle Studie an 36 Mäusen. Sie wurden nach dem Zufallsprinzip in eine Untersuchungsgruppe (PCI-Gruppe, n = 24) und eine Kontrollgruppe (*Sham*-Gruppe, n = 12) aufgeteilt. Bei den Mäusen der Untersuchungsgruppe wurde auf Grundlage des PCI-Modell-Protokolls (*peritoneal contamination and infection*, Gonnert et al. 2011) eine polymikrobielle Peritonitis induziert. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde statt des gepoolten, erregerhaltigen Stuhls eine Kochsalzlösung injiziert. Durch diese Scheininduktion sollten mögliche Störgrößen wie Futter und Stress als Ursache von Genexpressionsänderungen ausgeschlossen werden. Eine allein durch die Punktion induzierte Peritonitis und deren Auswirkung auf die Genexpression konnte klinisch weitgehend ausgeschlossen werden. Die Versuchstiere beider Gruppen wurden in drei Altersstufen (4, 12 und 24 Monate) aufgeteilt (Tab. 2). Jeder Altersgruppe wurden 8 Mäuse der Untersuchungsgruppe und 4 Mäuse der Kontroll-Gruppe zugewiesen. Diese simulierten die entsprechenden Altersstufen des Menschen (Abb. 2, Einleitung). Die Proben von 18 Mäusen wurden im weiteren Verlauf aufgrund von zu starker RNA-Degradation während der Aufbereitung verworfen (siehe Abschnitt 4.3.3). In den folgenden Ausführungen wird deshalb immer nur von den 18 intakten Proben gesprochen. 24 Stunden nach Sepsisinduktion durch das PCI-Modell wurden die Mäuse euthanasiert und Blut zur weiteren Analytik intrakardial entnommen.

	4 Monate	12 Monate	24 Monate
Sepsismäuse	M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9	M14, M15, M16, M17, M18, M19, M20, M21	M26, M27, M28, M29, M30, M31, M32, M33
Kontrollmäuse	M10, M11, M12, M13	M22, M23, M24, M25	M34, M35, M36, M37

Tab. 2: Nummerierung der verwendeten Mäuse. Die Proben der rot markierten Mäuse wurden im weiteren Verlauf der Studie verworfen. Die blau markierten Mausproben wurden im *Microarray* Versuch verwendet. Die schwarz und blau markierten Mausproben wurden in der qRT-PCR verwendet.

4.2 Tiermodell

4.2.1 Mauseaufzucht

Die Aufzucht und Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen mit 23 °C Raumtemperatur, artifizielltem Tag-Nacht-Rhythmus (12h Licht-Dunkel-Zyklus), 30-60% Luftfeuchtigkeit, standardisiertem Mausefutter und Wasser *ad libitum* sowie wöchentlichen Streuwechsel in der Service-Einheit-Kleinnager (SEK) des Forschungszentrums Jena. Es wurden männliche Wildtyp-Mäuse vom Stamm C57BL/6 Jackson mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 26 g bei der Blutentnahme verwendet. Sämtliche Experimente wurden unter der Genehmigung des Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz durchgeführt (Tierversuchsgenehmigung 02-118/11).

4.2.2 Polymikrobielle Sepsisinduktion

Die Induktion der polymikrobiellen Sepsis erfolgte nach dem etablierten Protokoll des PCI-Modells nach Gonnert et al. (2011). Zur Präparation der humanen Faeces-Suspension wurde der Stuhl von gesunden Nichtvegetariern genutzt. Die Faeces wurden gepoolt und entsprechend des Protokolls verarbeitet. Die Ermittlung der Koloniezahlen der Bakterienspezies erfolgte im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena (Tab. 3 und 4). Anschließend wurden 1,75 ml/kg KG der gepoolten Suspension mit physiologischer Kochsalzlösung (*Fresenius, Bad Homburg v.d.H., Deutschland*) verdünnt (1:4) und den PCI-Mäusen unter lokaler Anästhesie und aseptischer Technik mit einer 21-Gauge Kanüle (*Sterican 100, Braun, Melsungen, Deutschland*) in den rechten unteren Abdominalquadranten injiziert. Um versehentliche Organverletzung durch die Nadel zu verhindern, wurde die Bauchhaut mit einer Pinzette angehoben. Die Mäuse der Sham-Gruppe erhielten in gleicher Technik gewichtsadaptiert nur physiologische Kochsalzlösung gleichen Volumens. Nach 24 Stunden erfolgte die klinische Untersuchung der Mäuse auf Symptome, die auf eine Sepsis hindeuteten und somit den Erfolg der Sepsisinduktion bestätigten: Alle Mäuse der PCI-Gruppe imponierten mit lethargischem Verhalten, verspäteter bis fehlender Reaktion auf Schmerzreize und gekrümmter Körperhaltung. Im Anschluss wurden die Tiere durch

intraperitoneale Injektion einer letalen Ketamindosis (200 µl pro Tier; *Ketavet®*, 1:1 verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung) euthanasiert. Nach Eröffnung des Thorax wurde 2,5 ml Blut durch direkte Punktion des rechten Ventrikels in ein *PAXgene® Blood RNA* Blutröhrchen (*PreAnalytix®, QIAGEN, Hilden, Deutschland*) aspiriert.

Bakterienspezies	Koloniezahl [KBE/ml]
E. coli	4,8 x 10 ⁵
G Streptokokken	2,0 x 10 ⁵
Enterokokken	5,0 x 10 ⁵
Klebsiella oxytoca	0,5 x 10 ⁵
Peptostreptokokken	360 x 10 ⁵
Veillonella	320 x 10 ⁵
Bacteroides	410 x 10 ⁵
Pervotella	10 x 10 ⁵

Tab. 3: Mikrobiologische Analyse der gepoolten Faeces (1).
Einteilung nach phänotypisch identifizierten Bakterienspezies.
Angaben in Kolonie bildenden Einheiten pro ml.

Gruppen	Koloniezahl [KBE/ml]
Aerobier	1,23 x 10 ⁶
Anaerobier	1,0 x 10 ⁶
Gram-positiv	36,7 x 10 ⁶
Gram-negativ	74,5 x 10 ⁶

Tab. 4: Mikrobiologische Analyse der gepoolten Faeces (2).
Einteilung nach Bakteriengruppen. Angaben in Kolonie bildenden Einheiten pro ml.

4.3 Blutprobenverarbeitung

4.3.1 *In vivo* Genexpressionsprofil Stabilisierung und Isolation

Ein Hauptproblem bei Experimenten mit RNA ist deren Instabilität *in vitro*. Durch Geninduktion nach der Blutentnahme, enzymatische RNA-Degradation und Zelltod

verändert sich das Genexpressionsprofil innerhalb von Minuten bis um das Tausendfache, wenn sie bei Raumtemperatur bearbeitet und gelagert wird (Rainen et al. 2002). Deshalb benötigt man eine Technologie, die die Degradation und die *ex vivo* Genexpressions-Veränderung verhindert. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde hierfür das in vielen Studien angewandte *PAXgene® Blood RNA Kit* (Tab. 5) nach dem Protokoll für die automatische Reinigung der kompletten RNA (*QIAGEN PAXgene® Blood RNA Kit Handbuch, Version 2*) genutzt. Die einzelnen Schritte wurden im *QIAcube* (*QIAGEN, Katalog Nr. 9001293*) durchgeführt, einem Gerät zur automatisierten RNA-Isolation. Das Verfahren geht auf die von Chirgwin et al. (1979) eingeführte RNA-Isolation mit Guanidin Thiozyanat zurück. Chomczynski und Sacchi (1986) kombinierten dieses Verfahren mit Phenol-Chloroform, welches eine noch höhere Qualität und Reinheit zeigte.

Das in die *PAXgene® Blood RNA* Blutröhrchen gegebene Blut wurde geschüttelt und bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert, um eine komplette Lyse der Erythrozyten und eine Stabilisierung der RNA-Spezies zu erreichen. Das *PAXgene® Blood RNA*-Röhrchen enthält einen Zusatzstoff, der das Gentranskriptionsprofil *in vivo* durch Reduktion des RNA-Zerfalls *in vitro* und Minimierung der Geninduktion stabilisieren soll. Anschließend erfolgte eine erste Zentrifugation (4000 g, 10 min), um die partiell lysierten Leukozyten zu pelletieren. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit RNase-freiem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4000 g, 10 min) und Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet mit dem Resuspendierungspuffer BR-1 resuspendiert. Zum Proteinverdau wurde das Pellet zusammen mit Bindungspuffer BR-2 und Proteinase K für 10 min bei 55 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Um vorhandene Zelltrümmer zu entfernen, erfolgte eine dritte Zentrifugation (10000 g, 3 min). 700 µl des Überstandes wurden in eine *PAXgene RNA Spin-Säule* pipettiert und mit 350 µl reinem Ethanol versetzt. Das Ethanol unterstützt die spezifische Bindung der RNA an die *PAXgene®* Silizium-Gel Membran der Spin-Säule, während Verunreinigungen durch eine kurze Zentrifugation (10000 g, 1 min) die Membran passieren. Verbliebene Verunreinigungen wurden durch drei weitere Wasch- und Zentrifugationsschritte mit den Waschpuffern BR-3 (1x) und BR-4 (2x) entfernt. Zwischen den beiden BR-4

Waschschritten wurde die verbliebene DNA durch eine 15-minütige Inkubation mit *DNase I* abgebaut. In einem letzten Schritt wurde die RNA durch den Auswaschpuffer BR-5 eluiert und anschließend für fünf Minuten unter ständigem Schütteln bei 65 °C inkubiert. Die so aufgereinigten RNA-Proben wurden bei über -20 °C tiefgefroren. Aufgrund ihrer direkten Stabilisierung nach der Blutabnahme repräsentiert die gewonnene RNA-Fraktion sehr gut das Expressionsprofil *in vivo*.

PAXgene Blood miRNA Kit (50)	Anzahl/Volumen
Buffer BR1 (resuspension buffer)	20 ml
Buffer BR2 (binding buffer)	18 ml
Buffer BR3 (wash buffer concentrate)	15 ml
Buffer BR4 (wash buffer concentrate)	11 ml
Buffer BR5 (elution buffer)	6 ml
RNase-Free DNase Set: • RNase-Free DNase I (lyophilized) • Buffer RDD (DNA digestion buffer) • RNase-Free Water	1500 units 2 x 2 ml 1.5 ml
PAXgene RNA Spin Columns (red)	50
PAXgene Shredder Spin Columns (lilac)	50
Microcentrifuge Tubes (1.5 ml)	3 x 50 1 x 10
Processing Tubes (2 ml)	6 x 50
RNase-Free Water	2 x 125 ml
Proteinase K	2 x 1.4 ml
Secondary Hemogard Closures	50

Tab. 5: PAXgene Blood miRNA Kit. Liste der im PAXgene Blood miRNA Kit vorhandenen Reagenzien und Röhrchen, bestellt unter der Katalognummer 763134.

4.3.2 Konzentrationsbestimmung

Um den Nachweis von ausreichend isolierter RNA zu führen, wurde eine Konzentrationsbestimmung mittels des Nanodrop-Spektrometers (*Thermo Scientific, Wilmington, USA*) bei 260 nm vorgenommen. Die tiefgefrorenen Proben wurden

aufgetaut, geschüttelt und einer dreifachen Bestimmung unterzogen. 1,5 µl je Probe wurden zwischen zwei fiberoptische Fasern gebracht. Die Oberflächenspannung ermöglicht die Brückenbildung der Probe zwischen beiden Fasern. Das Signal eines gepulsten Xenon-Lasers wird vom Spektrometer erfasst und die Abschwächung durch die geräteeigene Software ausgewertet. Zusätzlich erfolgte eine Kontaminationskontrolle durch Quotientenbildung der Absorptionswerte bei 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm.

Der Quotient 260/280 zeigt eine mögliche Kontamination von Proteinen, Phenolen und anderen bei 280 nm absorbierenden Stoffen an. Werte < 1,5 signalisieren eine starke Verunreinigung, während ein Quotient um 2 einer als „rein“ zu wertenden RNA entspricht. Letzteres traf für alle 18 in diesem Experiment verwendeten aufgereinigten RNA-Proben zu. Der Quotient 260/230 erfasst Verunreinigungen mit niedermolekularen Stoffen wie Überresten von Puffersubstanzen und Detergenzien. Auch hier gilt ein Quotient um 2 als „rein“. Sämtliche 18 Proben lagen zwischen 1,8 und 2,2 und konnten daher als Qualitätsentsprechend angenommen werden.

4.3.3 Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurde eine Gelelektrophorese nach dem Protokoll „*Experion-RNA Standard Sens Kit*“ durchgeführt. Mit Hilfe des *Experion® Systems* (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, USA) konnte die Mikrokapillarelektrophorese automatisiert werden und ist somit weitestgehend untersucherunabhängig. Je 3 µl *RNA-Ladder* und 4 µl der zu untersuchenden Probe wurden bei 70 °C für zwei Minuten denaturiert und anschließend auf Eis gelegt. Die Gel-tragenden Chips wurden entsprechend des Protokolls vorbereitet und beladen. Das nun angelegte elektrische Feld trennt die RNA nach ihrer Größe auf. Durch einen interkalierenden Farbstoff können die so aufgetrennten RNA-Fragmente durch eine laseroptische Messung erfasst werden.

Die Qualität der RNA kann sowohl über die Schärfe der ribosomalen 18S und 28S Banden als auch durch den *RNA Quality Indicator (RQI)* bestimmt werden. Der RQI ist ein Algorithmus der Gerätesoftware, der die Elektrophogramme der RNA-Proben mit einer Reihe standardisierter RNA-Proben (von intakt bis vollkommen degradiert)

vergleicht. Die Ergebnisse werden auf einer Skala von 1 bis 10 wiedergegeben, wobei 1 stark degradierte RNA und 10 vollkommen intakter RNA entspricht. Werte über 7 gelten als unbedenklich für die weitere Verwendung der RNA. Werte zwischen 4 und 7 deuten auf mögliche Fehlerquellen in der späteren Auswertung durch zu stark degradierte RNA hin und Werte unter 4 zeigen eine zu stark degradierte RNA an, um sie noch für weitere Versuche gebrauchen zu können. Der RQI erlaubt eine zuverlässige Beurteilung der RNA-Qualität und ist damit eine wesentliche Grundlage für die Entscheidung über die Weiterverwendung der RNA-Proben (Denisov et al. 2008).

Besonders bei der Arbeit mit miRNA ist auf eine hohe Qualität zu achten, da sie aus nur wenigen Basenpaaren besteht und relativ instabil ist. Die Verwendung von RNA mit niedriger Qualität beeinflusst die Ergebnisse nachfolgender Experimente deutlich, so dass eine aussagekräftige Bewertung nicht mehr gewährleistet ist (Fleige und Pfaffl 2006). Daher wurden alle Proben mit verschmierten 18S und 28S Banden und mit einem RQI < 7 vom Experiment ausgeschlossen. Dies traf für 18 der 36 Proben zu. Sie wurden verworfen. Je Untergruppe (Tab. 2, Abschnitt 4.1.) blieben zwei bis vier Ansätze erhalten.

4.4 *Bead-Array* Genexpressionsanalyse

Bei der Genexpressionsanalyse wurde auf die *Bead-Microarray* Technologie zurückgegriffen. *Microarray* Platten arbeiten über die komplementäre Bindung zweier Einzelstrang-RNA-Strukturen. Das Prinzip beruht auf der genauen Positionierung von spezifischen Basensequenzen in einer hohen Dichte in kleinen Vertiefungen mit einem Durchmesser von 3 μm auf einer Glasoberfläche (Chip). Diese Verdichtungen („*Beads*“) enthalten eine spezifische komplementäre Sequenz zum Oligonukleotid. Pro *Bead* wird ein spezifisches Oligonukleotid in hunderttausendfacher Kopie aufpipettiert und die Position vom Hersteller bestimmt. Diese Oligonukleotide dienen als molekulare Detektoren (Holloway et al. 2002, Southern et al. 1999).

Eine komplementäre Sequenz auf dem Chip bindet hierbei an die entsprechende Sequenz des Oligonukleotids, der zusätzlich einen fluoreszierenden Farbstoff

enthält. Der Chip wird von einem Scanner ausgelesen. Da die Verteilung der einzelnen Sequenzen auf der Glasoberfläche vom Hersteller bestimmt wurde und somit bekannt ist, kann anhand der Lokalisation und Intensität der fluoreszierenden Punkte auf das quantitative und qualitative Vorhandensein von RNA in der ursprünglichen Probe geschlossen werden.

4.4.1 Versuchsaufbau

Hierfür wurde auf das *Illumina® MicroRNA Expression Profiling Assay Mouse v2* zurückgegriffen (*Illumina® Inc., San Diego, Kalifornien, USA*). Es deckt 95% der miRNAs auf miRBase v12.0 (Griffiths-Jones et al. 2006) ab und repräsentiert damit die große Mehrheit aller bis dahin gekannten miRNAs (2009). Der Chip enthält 12 alphabetisch durchnummerierte Reihen mit je 380 verschiedenen *Beadtypen*. Jede Reihe ermöglicht die Analyse einer Mausprobe. Entsprechend wurden von den drei Altersstufen je zwei PCI und zwei *Sham*-Proben ausgewählt. Jeder *Array* führt eine auf Hybridisierung basierenden Qualitätskontrolle mit.

Die Versuche wurden streng nach dem Protokoll „*MicroRNA Expression Profiling Assay Guide - Lab Protocols for BeadChips*“ von *Illumina® Inc.* durchgeführt. In zwei Schritten wurde die miRNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit einem spezifischen Oligonukleotid, das einen Amplifikationsprimer enthielt. Nach dem Auswaschen der nichthybridisierten miRNA wurde eine Polymerase zugesetzt und die Oligonukleotide verlängert. Durch diesen Amplifikationsschritt war es möglich, mit 100-200 ng miRNA pro Versuch auszukommen. Da die Mausproben miRNA in nur geringen Mengen enthalten, bringt das einen wesentlichen Vorteil. Nach dem Auftragen auf den Chip bindet die entstandene Kopie der cDNA über die Oligonukleotide an ihre komplementäre Sequenz auf dem *Bead*.

Zum Scannen wurde das „*Illumina iScan System*“ eingesetzt, das die Intensität jedes *Beads* mit Hilfe eines Lasers vermisst. Dabei ist die Intensität direkt proportional zur Quantität der entsprechenden miRNA in der Mausprobe. Die so gewonnenen Daten wurden durch „*Illumina's GenomeStudio Gene Expression Module*“ verarbeitet und durch *Entrez Gene ID (Version R4)* von *Illumina Inc.* visualisiert.

4.4.2 Normalisierung und statistische Auswertung

Die Normalisierung der Daten sowie die bioinformatische und statistische Auswertung wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. M. Kohl (Bioinformatik und Biostatistik, Fakultät Maschinenbau und Verfahrenstechnik, Hochschule Furtwangen) vorgenommen. Zur Analyse wurde die *R Statistics Software* (Version 2.8, *R Development Core Team* 2009) in Kombination mit *BioConductor* (Version 2.3, Gentleman et al. 2004) eingesetzt.

Die von der *Illumina's GenomeStudio Software* ausgegebenen Daten wurden zuerst einer Qualitätskontrolle unterzogen. Nur *Beadtypen* mit einem Detektionsniveau $p < 0,01$ wurden zur Analyse ausgewählt. Weiterhin wurde die Anzahl der *Beads* pro *Beadtyp* (ein *Beadtyp* entspricht einer miRNA) mit Boxplots visualisiert (Abb. 6). Pro *Beadtyp* konnten durchschnittlich 350 einzelne *Beads* ausgewertet werden. Die hohe Replikation der *Beads* ermöglicht die Minimierung technischer Fehler und erhöht die Messgenauigkeit.

Bei dem Vergleich der einzelnen Reihen gegeneinander lag der Rangkorrelationsquotient nach Spearman zwischen 0,77 und 0,97 und dokumentiert somit einen hohen Zusammenhang zwischen den Daten. Anschließend wurden die Daten über die Variabilitäts-Stabilitäts-Methode nach Huber et al. (2002) normalisiert und die Abhängigkeit von Intensität und Variabilität der Daten in einem Mittelwert-Standardabweichungsdiagramm untersucht (Abb. 7). Es konnte gezeigt werden, dass unabhängig vom Mittelwert der Daten die Standardabweichung relativ konstant blieb, was auf eine nur geringe Abhängigkeit der Standardabweichung vom Mittelwert schließen lässt.

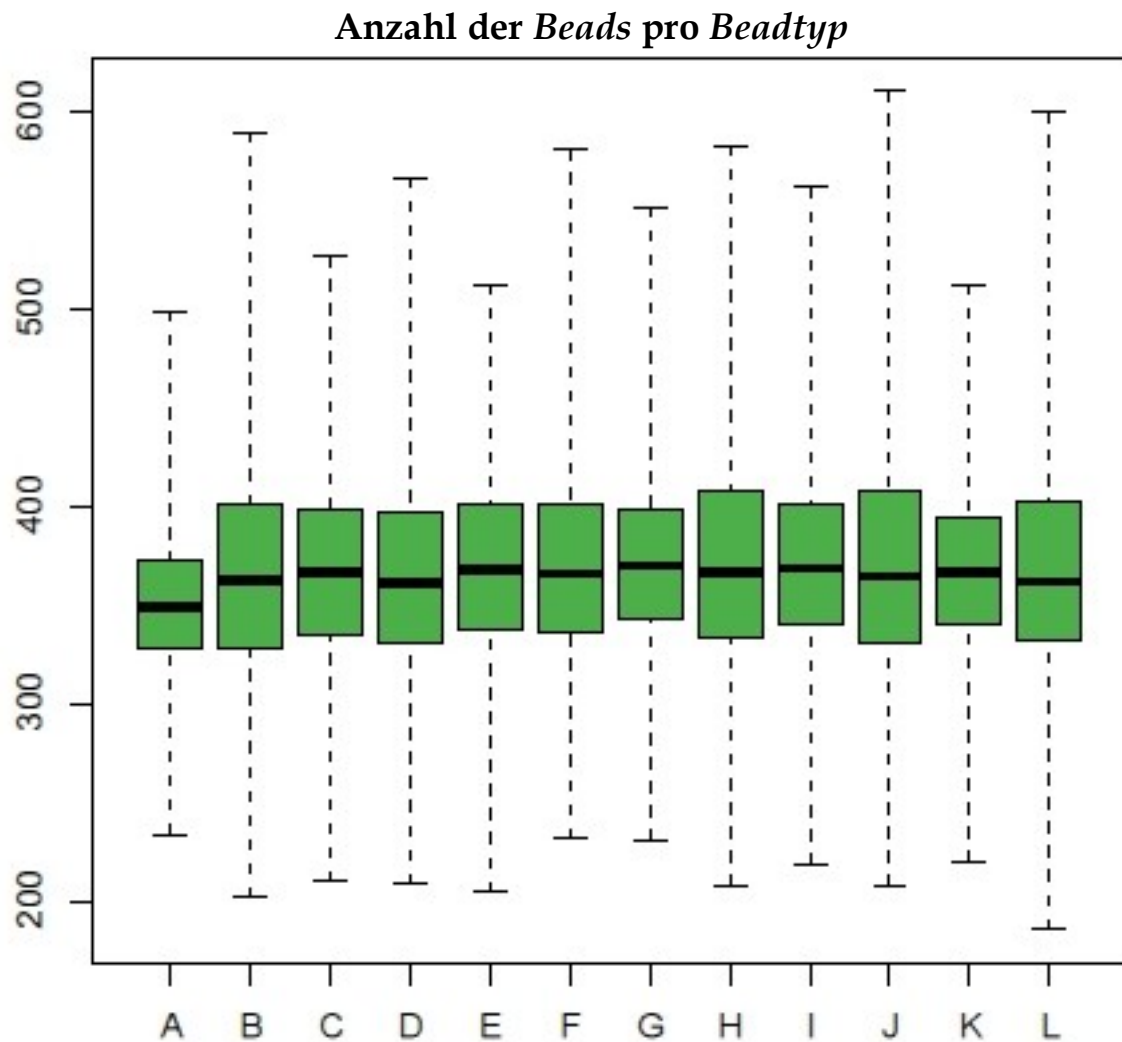


Abb. 6: Anzahl der Beads pro Beadtyp. Im Durchschnitt hat jede Reihe ca. 350 Beads pro Beadtyp, nie jedoch weniger als 187 Beads pro Beadtyp. (alphabetische Nummerierung der 12 Reihen = 12 Mausproben).

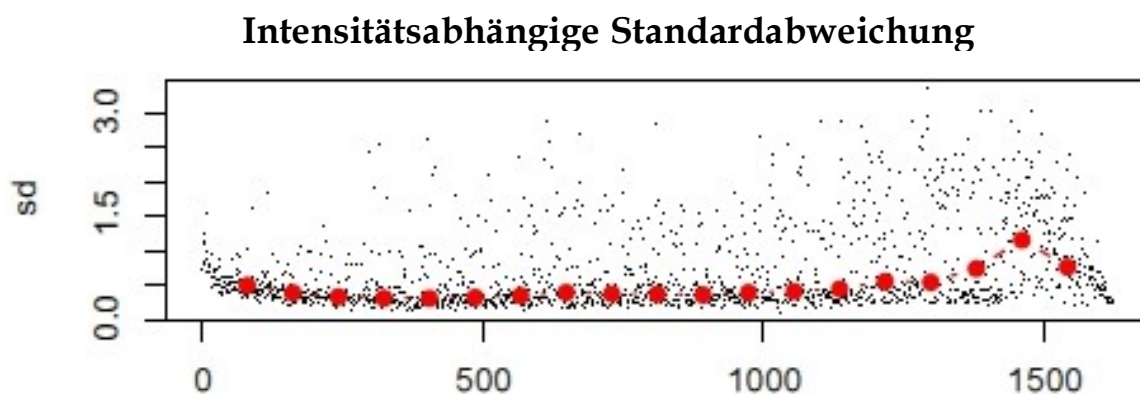


Abb. 7: Intensitätsabhängige Standardabweichung. Normalisierte, log-transformierte Intensitätsdaten in Abhängigkeit von der Variabilität. Die Standardabweichung sd blieb relativ konstant bei steigender Intensität (x-Achse). Nur bei extrem hohen Intensitäten erhöht sich die Standardabweichung.

Zur statistischen Analyse wurden die Daten des *Microarray* Versuchs in einem ersten Schritt paarweise zwischen den einzelnen Altersgruppen verglichen und dann diejenigen Transkripte, welche einen $\log_2\text{-Fold Change (FC)} > 2$ zwischen den Altersstufen aufwiesen, in Venn-Diagramme eingetragen. Abgebildet wurden jeweils die Alterstufen der Untersucherguppe (PCI) untereinander und die der Kontrollgruppe (*Sham*) untereinander. Gezeigt werden sollte dadurch der in dieser Arbeit hypothetisch aufgestellte Unterschied der Genexpression abhängig vom Alter. In einem zweiten Schritt wurde der Behandlungseffekt nachgewiesen. Dazu wurden PCI-Mäuse einer Altersstufe mit ihren korrespondierenden *Sham*-Mäusen gleicher Altersstufe nach derselben Vorgehensweise verglichen. Auch hier sollte die Hypothese der differenzierten Genexpressionsänderung mit dem Alter abhängig von der Sepsisinduktion gezeigt werden.

Weiterhin wurden alle logarithmierten Genexpressionsdaten einer Clusteranalyse zugeführt. Nur differenziert exprimierte Gene mit einem $\log_2\text{FC} > 2$ kamen in die Analyse. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Mittelwert aller Gene vom FC subtrahiert. Die Clusteranalyse erfolgte nach demselben Schema wie die Venn-Diagramm Analyse. Zuerst wurden die Untersucherguppen untereinander und dann die Kontrollgruppen untereinander verglichen. Im zweiten Schritt wurde der Behandlungseffekt gezeigt, indem die beiden Gruppen gegeneinander verglichen wurden.

Venn-Diagramme gehören zu der Gruppe der Mengendiagramme. Sie gehen auf den englischen Mathematiker John Venn zurück, der sie in seiner Schrift „*Symbolic Logic*. London: Macmillan 1881“ einführte. Sie sind besonders für mehr als zwei zu vergleichende Datengruppen geeignet. Da sie alle Relationen zwischen den Datenmengen aufzeigen, eignen sie sich als Beweis für Mengenbeziehungen.

Die Clusteranalyse ist ein Verfahren zur Aufdeckung von Ähnlichkeitsstrukturen in großen Datenbeständen. Da diese Berechnung der Gemeinsamkeiten ohne das Wissen der Gruppenzugehörigkeit geschieht (*unsupervised analysis*), ist es erlaubt, eine Aussage darüber zu treffen, inwieweit unterschiedliche Expressionen zwei verschiedene Gruppen beschreiben. Das in dieser Arbeit verwendete hierarchische

Clusterverfahren bedient sich dem *k-means* Algorithmus (Lloyd 1957). Bei diesem Algorithmus wird die Anzahl an Clusterzentren vorher festgelegt und die Daten abhängig von ihrer Ähnlichkeit den Zentren zugeordnet. Diese so gebildeten Clusterzentren einer Datenmenge können dann gegen Clustergruppen anderer Datenmengen verglichen werden und vorhandene Ähnlichkeiten aufdecken oder widerlegen (Ester und Sander 2000). Als Proximitätsmaß wurde der Pearson Korrelationskoeffizient genutzt.

4.5 Selektion differenziert exprimierter miRNAs

Die Fortschritte in der *Microarray* Technologie, wie sie in Abschnitt 4.4. beschrieben wurde, ermöglichen die Untersuchung der Expressionslevel tausender Transkripte simultan. Aufgrund dieser großen Menge an Genen, wird der Schritt der Gen-Selektion zu einem der wichtigsten in einem Vorhersage-Model (Chen et al. 2007). Ziel war es aus dem 380 miRNA umfassenden Gen-Pool eine kleine Anzahl an miRNAs heraus zu filtern, die eine hohe Relevanz in der Regulation der Wirtsreaktion auf die Sepsisinduktion besitzen. Dies erfolgte in zwei Schritten.

4.5.1 DIANA-microT-4.0 (beta version) MOUSE

Wie bereits beschrieben kann eine miRNA viele Ziel-Transkripte regulieren, aber umgekehrt auch ein Ziel-Transkript von mehreren miRNAs kontrolliert werden. Aufgrund der Vielzahl diesbezüglicher Interaktionsmöglichkeiten ist ein klassischer, laborexperimenteller Ansatz zur Analyse der Funktion einer miRNA kaum durchführbar. Bis heute gibt es außerdem keine molekularen Hochdurchsatzverfahren, um die Ziel-Transkripte der miRNAs schnell und in großer Zahl zu bestimmen beziehungsweise aufgestellte Hypothesen validieren zu können (Lewis et al. 2003). Auf der Basis komplementärer Bindungsstellen sind computergestützte Algorithmen entwickelt wurden, um mögliche Vorhersagen treffen zu können. In dieser Arbeit wurde der Algorithmus der Datenbank DIANA Lab DNA Intelligent Analysis Database *microT-4.0 (beta version) MOUSE* (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/>) verwendet. Dieser Algorithmus ist trainiert, um miRNA Ziel-Transkripte mit nur einer Bindungsstelle zu identifizieren. Weiterhin sucht der Algorithmus nach Bindungen mit einer zentralen Blase (*Bulge*, siehe Einleitung

„miRNA Interaktion“) und setzt eine Bindung am 3'- und 5'-Ende der miRNA voraus (Kiriakidou et al. 2004).

In Zusammenarbeit mit dem Team des CSCC (*Centre for Sepsis Control and Care*) am Universitätsklinikum Jena wurden zehn Sepsis-relevante Signaltransduktionswege (*Pathways*) festgelegt. Im Einzelnen waren dies: *MAPK signaling pathway*, *T cell receptor signaling pathway*, *TGF- β signaling pathway*, *GAP junction*, *Focal adhesion*, *Adherens junction*, *Apoptosis*, *Toll-like receptor signaling pathway*, *Tight junction* und *Cytokine-cytokine receptor interaction*. Für sämtliche in der Liste der untersuchten miRNAs aus dem *Microarray* Experiment wurde geprüft, ob sie in Beziehung zu den zehn *Pathways* stehen. *DIANA microT* gibt für jede miRNA einen *p-Value* an. Der *p-Value* ist das wahrscheinliche Resultat eines statistischen Tests, der angibt, dass kein Unterschied in der Expression eines Transkriptes unter verschiedenen Bedingungen gegeben ist. Ein kleiner *p-Value* ist ein Indikator für eine Expressionsänderung. Für die festgelegten Signaltransduktionswege der jeweiligen miRNA wurde der *p-Value* abgelesen. Zusätzlich wurde geprüft, auf welchen Rängen die zehn *Pathways* im Vergleich zu den anderen, von der miRNA regulierten *Pathways* lagen. Je höher der Rang, desto bedeutsamer ist die miRNA in diesem *Pathway*. Berücksichtigt wurden außerdem die absolute Anzahl der bisherigen Funde sowie die der Transduktionswege, in die die miRNA involviert ist. Für sämtliche in dem *Microarray* Experiment untersuchten murinen miRNAs konnte so eine Rangfolgeliste erstellt werden, aus der 46 miRNA in die engere Auswahl gezogen wurden.

4.5.2 Dreidimensionales Schicht-Ranking

Michiels et al. (2005) konnten zeigen, dass beispielsweise die Auswahl einzelner Gene aus einem Pool für die Vorhersage der Krebsprognose sehr instabil war. Zwei häufig eingesetzte Kriterien zur Selektion sind der *p-Value* und der *Fold-Change* (FC). Beide sind von vielen Variablen abhängig und liefern unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits wird ein Transkript, das von Grund auf unabhängig vom Versuchsaufbau eine hohe Variabilität aufweist, durch einen hohen FC als differenziert exprimiert ausgewiesen und zu Unrecht selektiert. Andererseits können Transkripte mit einem kleinen FC aufgrund der kleinen Standarddeviation einen kleinen *p-Value* aufweisen,

der ebenfalls Anlass für eine ungerechtfertigte Selektion liefert. Chen et al. (2007) schlagen deshalb vor, univariante Rangkriterien mit Schicht-Ranking Algorithmen zu verbinden. In der vorliegenden Arbeit wird auf diese Möglichkeit zurückgegriffen, wobei als Schicht-Ranking die Algorithmen *Point-Admissible* (Barndorff-Nielsen und Sobel 1966) und *Pareto* (Fleury et al. 2002) genutzt wurden. Als univariantes Rangkriterium wird der *p-Value* herangezogen. Die ersten zehn miRNAs der so generierten Rangliste wurden für die weitere Analyse verwendet (Tab. 6). Ab der elften miRNA differieren die Algorithmen in ihrer Rangordnung der miRNAs untereinander zusehends. Diese miRNAs wurden nicht weiter verwendet.

Rang	Array Address_ID	Probe_ID	TargetMatureName	Rangsumme nach <i>p-Value</i>	PA	Pareto
1	3290	ILMN_3167755	mmu-miR-182	1	1	1
2	3042	ILMN_3168529	mmu-miR-106a	2	1	1
3	4180	ILMN_3168494	mmu-miR-181d	3	1	2
4	3183	ILMN_3168346	mmu-miR-152	4	1	1
5	3156	ILMN_3168105	mmu-miR-148a	5	1	1
6	3996	ILMN_3167437	mmu-miR-497	6	1	1
7	4161	ILMN_3167447	mmu-miR-9	7	1	1
8	3503	ILMN_3168323	mmu-miR-27a	8	1	1
9	3510	ILMN_3168409	mmu-miR-27b	9	1	1
10	6007	ILMN_3168933	mmu-miR-330	12	1	1
11	3824	ILMN_3168297	mmu-miR-365	20,5	1	3
12	6007	ILMN_3168933	mmu-miR-21	10	2	3
⋮						

Tab. 6: Liste der zehn ausgewählten miRNAs. Die zwei folgenden miRNAs zeigen beispielhaft die zunehmende Abweichung der Rangfolgen der einzelnen Algorithmen untereinander. Die zweite und dritte Spalte beziehen sich auf den *Microarray* Versuch. PA = *Point Admissible*

4.6 Quantitative Real-Time PCR

Die qRT-PCR ist eine Amplifikationsmethode für spezifische Nukleinsäuresequenzen, die auf dem Prinzip einer Polymerase-Kettenreaktion beruht. Zusätzlich lässt sich die gewonnene DNA mit Hilfe eines interkalierenden DNA-Farbstoffes (in dieser Arbeit *SYBR Green I*, Fa. *SABiosciences*) quantifizieren. Die

Fluoreszenz des Farbstoffes wird bei 490nm erfasst und nimmt proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu. Der Nachteil der Methode besteht in der geringen Spezifität. Deshalb wurde viel Wert auf Reinheit und Qualität der vorliegenden *Template*-cDNA gelegt und im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte anhand des Ct-Wertes aus der exponentiellen Phase der PCR, da nur hier optimale Reaktionsbedingungen vorliegen.

4.6.1 Reverse Transkription

RNA kann im Rahmen einer qRT-PCR nicht amplifiziert werden, da sie keine geeignete Matrize für die Polymerase darstellt (Kawasaki 1989). Es ist daher nötig, mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in einem Zwischenschritt zuerst eine zur RNA komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die entstehende cDNA dient dann als Ausgangsmatrize für die Amplifikation mittels qRT-PCR. Als Primer für die Reverse Transkription wurde ein Oligo-dT-Primer in Kombination mit einem Random-Hexamer-Primer verwendet.

Die Reverse Transkription erfolgte mit dem „*miScript Reverse Transcription*“ Kit von Qiagen, der die Transkription von RNA in cDNA in einem Schritt ermöglicht. Im Gegensatz zu mRNA besitzt die miRNA keinen poly(A)-Schwanz am 3'-Ende. Aus diesem Grund wird die miRNA während der reversen Transkription durch eine Poly(A)-Polymerase polyadenyliert. Durch Einsatz des unspezifischen Primers *Random Hexamer* sowie der *Reversen Transkriptase* ist eine Umschreibung des kompletten RNA-Musters in cDNA möglich. Das hat den Vorteil, dass mit der vorliegenden cDNA als Basismatrize nun verschiedene Transkripte mit unterschiedlichsten Primern untersucht werden können.

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich wurden zuerst RT-Puffer, RNase-freies Wasser und der Reverse Transkriptase-Mix zusammen pipettiert. Anschließend wurden volumenadaptiert 2 µg der Template-RNA dazu gegeben, das Ansatzvolumen mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und der gesamte Ansatz geschüttelt.

Inhalt	Volumen/Reagenz
miScript RT Puffer (Mg ₂ ⁺ , dNTPs, Oliogo-dT-Primer, Random-Hexamer-Primer)	4 µl
RNase-freies Wasser	15 µl - x µl (Template RNA)
miScript Reverse Transcriptase Mix (reverse Transkriptase und Poly(A)-Polymerase)	1 µl
Template RNA	2 µg = x µl

Tab. 7: Reagenzien für die reverse Transkription. RT-Puffer, RNase-freies Wasser und der Reverse Transkriptase-Mix wurden zuerst zusammen pipettiert. Anschließend volumenadaptiert 2 µg Template RNA hinzu gegeben.

Der fertige Ansatz wurde im *Thermocycler* für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch die sich anschließende Inkubation bei 95 °C für fünf Minuten wurde die Reaktion inaktiviert. Die fertigen Proben wurden sofort für vier Minuten auf Eis gekühlt. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -20 °C gelagert. Erfahrungsgemäß wird davon ausgegangen, dass die RNA nahezu komplett in cDNA umgeschrieben wurde.

4.6.2 Primerdesign

Um spezifisch das Expressionsniveau der zu untersuchenden miRNAs bestimmen zu können, werden für die qRT-PCR Primer benötigt, die exakt zur Basensequenz der zu untersuchenden miRNAs komplementär korrespondieren.

Ausgewählt wurden deshalb Primer mit einer Länge von 23 ± 2 Basenpaaren, die eine hochspezifische Amplifikation einer Sequenz von 80 bis 200 Basenpaaren ermöglichen. Die Schmelztemperatur (T_m) sollte bei 76 ± 2 °C liegen und der Anteil der organischen Basen Guanin und Cytosin 45 - 65% nicht unter- bzw. überschreiten. Homologe Sequenzmotive wurden vermieden, um die Entstehung von Primer-Dimeren zu vermeiden. Die Spezifität für die entsprechenden Gene wurde mittels der oben beschriebenen Genomdatenbank *DIANA-microT-4.0 (beta version) MOUSE (DIANA Lab Intelligent Service)* sichergestellt.

Die Tabelle 8 gibt eine Übersicht der Basensequenzen der bestellten Primer wieder. Sämtliche Primer wurden über *QIAGEN Sample and Assay Technologies* (<https://www.qiagen.com/geneglobe/default.aspx>) bezogen. Der *forward*-Primer entspricht dem spezifischen *Primer-Assay*, während der *reverse*-Primer dem Universalprimer entspricht.

Name	Datenbank und Bestellportal	Basensequenz	Bestell-ID
miR-182	Mature Sequenz DIANA LAB forward-Primer (5'→3') QIAGEN reverse-Primer (3'→5') QIAGEN	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACA UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACCG GUGGUUCUAGACUUGCCAACU	MS00011291
miR-106a	Mature Sequenz DIANA LAB forward-Primer (5'→3') QIAGEN reverse-Primer (3'→5') QIAGEN	CAAAGUGCUAACAGUGCAGGUA CAAAGUGCUAACAGUGCAGGUAG ACUGCAGUGCCAGCACUUCUAC	MS00011039
miR-181d	Mature Sequenz DIANA LAB forward-Primer (5'→3') QIAGEN reverse-Primer (3'→5') QIAGEN	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGUU AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU CCCACCGGGGAUGAAUGUCA	MS00011284
miR-152	Mature Sequenz DIANA LAB forward-Primer (5'→3') QIAGEN reverse-Primer (3'→5') QIAGEN	UCAGUGCAUGACAGAACUUGGG UCAGUGCAUGACAGAACUUGG UAGGUUCUGUGAUACACUCCGACU	MS00001687
miR-148a	Mature Sequenz DIANA LAB forward-Primer (5'→3') QIAGEN reverse-Primer (3'→5') QIAGEN	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU UCAGUGCACUACAGAACUUUGU AAAGUUCUGAGACACUCCGACU	MS00001652
miR-497	Mature Sequenz DIANA LAB forward-Primer (5'→3') QIAGEN reverse-Primer (3'→5') QIAGEN	CAGCAGCACACUGUGGUUUGUA CAGCAGCACACUGUGGUUUGUA CAAACCACACUGUGGUGUAG	MS00002569
miR-9	Mature Sequenz DIANA LAB forward-Primer (5'→3') QIAGEN reverse-Primer (3'→5') QIAGEN	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUG UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA AUAAAGCUAGUAACCGAAAGU	MS00012873
miR-27a	Mature Sequenz DIANA LAB forward-Primer (5'→3') QIAGEN reverse-Primer (3'→5') QIAGEN	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC UUCACAGUGGCUAAGUCCGC AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	MS00001351
miR-27b	Mature Sequenz DIANA LAB forward-Primer (5'→3') QIAGEN reverse-Primer (3'→5') QIAGEN	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC	MS00001358
miR-330	Mature Sequenz DIANA LAB forward-Primer (5'→3') QIAGEN reverse-Primer (3'→5') QIAGEN	GGGCCUGUGUCUAGGC UCUCUGGGCCUGUGUCUAGGC GCAAAGCACAGGGCCUGCAGAGA	MS00011816

Tab. 8: Liste der ausgewählten Primer. Aufgelistet sind die *forward*- und *reverse*-Primer mit ihren spezifischen Basensequenzen verglichen mit der *mature*-Sequenz der miRNA aus der *DIANA-LAB*-Datenbank und ihrer Bestellnummer.

4.6.3 Standardkurvenanalyse zur Effizienzbestimmung

Gerade bei niedriger Genexpression werden die tatsächlichen Primer-Effizienzen oft falsch eingeschätzt. Faktoren wie verwendete Geräte, Variationen beim Pipetieren, das eventuelle Vorhandensein von Inhibitoren im Ansatz und die absolute Masse der Template-cDNA beeinflussen die Effizienz der Primer. Um die Effizienz zu verifizieren, eignen sich Standardverdünnungsreihen. Eine optimale Effizienz ist erreicht, wenn sich die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt. Auch für die Referenzgen-Transkripte sollte die Effizienz bestimmt werden und ähnlich denen der untersuchten Ziel-Transkripte sein. Der Optimalwert liegt bei $E > 1.8$ (Wiedemann et al 2004).

Um das Genexpressionsmuster der miRNA relativ zu quantifizieren sowie zur Kontrolle der Qualität der Primer wurde für jeden Primer vorab eine Verdünnungsreihe angelegt. Dafür wurde die Probe der Maus M27 verwendet. Sieben Verdünnungsstufen von 10^{-4} bis 10^{-10} wurden in Dreifachbestimmung der einzelne Stufe angelegt. Die Endkonzentrationen der aufgereinigten cDNA betrugen entsprechend 625 fg bis $625 \cdot 10^{-6}$ fg. Die Ansätze wurden wie in Tabelle 10 angegeben pipettiert und mit der qRT-PCR amplifiziert. Je geringer die Konzentration des cDNA Template war, desto später stieg der Fluoreszenzfarbstoff an und entsprechend vergrößerte sich der Ct-Wert. Trägt man diese Ct-Werte in ein Diagramm gegen die Konzentration der miRNA (halblogarithmische Auftragung) auf, so erhält man eine lineare Funktion mit negativem Anstieg. Unter Verwendung der Pfaffl-Formel $E = 10^{-1/\text{slope}}$ konnte mit Hilfe des negativen Anstiegs („Slope“) die Effizienz der Primer berechnet werden (Pfaffl 2001). Ein Wert zwischen 1,8 und 2 gilt als optimal (Tab. 9). Die negativen Anstiege wurden dabei automatisch von dem Analyseprogramm der *Rotorgene Q Series* berechnet. Bis auf das Referenzen RNU6B erreichten alle Primer eine Effizienz $> 1,8$. Gleichzeitig wurde auch das Bestimmtheitsmaß r^2 berechnet. Hier gilt, je näher das Bestimmtheitsmaß r^2 an 1 liegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit des linearen Zusammenhangs zwischen der Konzentration der cDNA und dem Ct-Wert. Das Bestimmtheitsmaß stellt also eine Maßzahl für die Güte der Anpassung dar. Bei allen Primern lag r^2 über 0,96. Daher kann von einem linearen Verhältnis ausgegangen werden.

	<i>Efficiency</i>	<i>r²</i>		<i>Efficiency</i>	<i>r²</i>
miR-9	1,83	0,99146	miR-182	1,86	0,96444
miR-106a	1,93	0,99557	miR-181d	1,85	0,99221
miR-152	2,00	0,93253	miR-497	1,84	0,98261
miR-27a	2,00	0,98352	RNU6B	1,74	0,99336
miR-27b	1,91	0,9923	SCARNA	1,94	0,99875
miR-148a	2,00	0,99415	RNU5A	1,82	0,99652
miR-330	1,82	0,98815			

Tab. 9: Effizienzen und Bestimmtheitswerte. Berechnet nach der Pfaffl-Formel für alle miRNAs.

4.6.4 qRT-PCR-Versuchsaufbau

Benötigte Reagenzien und Primer wurden sämtlich über *QIAGEN* (<http://www.qiagen.com/products/byapplication/mirna/default.aspx?WT.sol=m>) bezogen. Die gelieferten Primer wurden in einem ersten Schritt mit 550 µl TE Puffer versetzt (pH 8,0, bestehend aus 10 mM Tris · Cl, 1 mM EDTA in 100 ml RNase freiem Wasser) und sechs mal auf einem Vortexer geschüttelt (*Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA*). Die Ansätze wurden entsprechend dem Protokoll im *miScript PCR System Handbook 2009* von *QIAGEN* pipettiert (Tab. 10). Auf Grund geringer Probenmenge wurde das jeweilige Volumen halbiert (vorgegeben waren ursprünglich ein Ansatz von 20 µl je *Tube*).

Das *QIAGEN*-Protokoll empfiehlt pro Ansatz eine cDNA-Menge von 1 - 3 ng. Die 2 µl *Template cDNA* wurde in dieser Untersuchung soweit verdünnt, dass sich absolut 1,25 ng cDNA im Ansatz befanden. Höhere Mengen würden zu einer Amplifikation unspezifischer PCR Produkte führen, die wiederum die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Die Empfehlung, dass das Volumen der cDNA nicht 10% des Ansatzes überschreiten sollte, wurde eingehalten (*QIAGEN Handbook 2009*).

Bausatz	Inhalt	Volumen
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	HotStarTaq® DNA Polymerase QuantiTect SYBR Green PCR Buffer dNTP mix, including dUTP SYBR Green I ROX passive reference dye 5 mM MgCl ₂	5 µl
miScript Universal Primer	„reverse“ Primer	1 µl
miScript Primer Assay (Gene Globe)	spezifischer Primer der jeweiligen miRNA	1 µl
RNase-free water		1 µl
Template cDNA	aufgereinigte revers transkriptierte Leukozyten-miRNA der jeweiligen Maus 1,25 ng/2 µl	2 µl

Tab. 10: Reagenzien für die qRT-PCR. Die Reagenzien wurden entsprechend dem Protokoll des *miScript PCR System Handbook 2009* zusammen pipettiert, Die Volumenangaben wurden halbiert, sodass sich im fertigen Ansatz insgesamt 10 µl je Tube befanden.

Nach dem Auftauen der tiefgefrorenen Reagenzien wurden in einem ersten Ansatz alle 13 Primer nach dem in Tabelle 10 angegebenen Protokoll auf das sogenannte „Selfannealing“ hin überprüft. Es wurde getestet, ob die Primer ausschließlich mit den ihnen kongruenten Basenpaaren der miRNA reagieren und nicht mit sich selbst. Dafür wurden anstatt des cDNA-Templates weitere 2 µl RNase-freies Wasser hinzu gegeben. Für alle 13 Primer Assays konnte gezeigt werden, dass der Fluoreszenzfarbstoff auch nach 50 Zyklen keinen Anstieg zeigte. In den späteren Versuchen mit dem cDNA-Template wurde zur Kontrolle nochmals je eine Probe mit RNase-freiem Wasser mitgeführt.

Als nächstes wurde der für die qRT-PCR benötigte Reaktions-Mix, bestehend aus den ersten vier Reagenzien entsprechend der Tabelle 10 hergestellt. Anschließend wurde die Template-cDNA der jeweiligen Maus durch kurzes Vortexen homogenisiert. Danach wurden 2 µl der Template-cDNA in ein 50 µl Eppendorf-Röhrchen gegeben und der Reaktionsmix hinzugefügt. Der Ansatz wurde ein weiteres Mal mit dem Vortexer homogenisiert und danach zentrifugiert.

Um Abweichungen in den unterschiedlichen qRT-PCR-Läufen zu vermeiden, wurden alle Ansätze für einen Primer in einem Lauf analysiert. Pro Primer ergaben

sich so 20 Ansätze, 18 davon für jede Maus, einer für die Wasser-Leerprobe und einer mit dem Template-Mix aller Mäuse. Da im verwendeten *Cycler Corbett Rotor Gene 6000* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) 72 Ansätze pro Lauf analysiert werden können, konnten pro Lauf drei miRNA-Primer untersucht werden. Die Wasser-Leerprobe wurde mitgeführt, um eventuelle Verschmutzungen oder *Selfannealing*-Prozesse auszuschließen. Jede der 18 cDNA-Templates der Mausproben wurde so mit jedem der 10 spezifischen miRNA-Primer amplifiziert. Entsprechendes gilt auch für die Referenzgene. Im Anschluss wurden die 60 Ansätze pro Lauf mit *Rotor Gene 6000* vermessen. Auch hier wurde das Zyklusprotokoll aus dem *miScript PCR System Handbook 2009* übernommen (QIAGEN Handbook 09, Tab. 11).

4.6.5 Ct-Wert-Bestimmung

Die Ergebnisse der qRT-PCR werden im Analyseprogramm des *Rotor Gene* in einer sigmoidalen Amplifikations-Kurve (Zyklusanzahl gegenüber Fluoreszenzsignal) dargestellt (Abb. 8). Zur Berechnung der Genexpression der miRNA in der jeweiligen Probe mittels relativer Quantifizierung (siehe Abschnitt 4.6.8.) benötigt man den Ct-Wert (*threshold cycle*). Dieser Wert markiert den ersten Zyklus, von dem ab ein messbarer Anstieg des Fluoreszenzfarbstoffes registriert wird. Die davor geschaltete Phase bezeichnet man als „Baseline“. Hier findet keine Fluoreszenzsteigerung statt. Nach der exponentiellen Phase mit dem *threshold cycle* folgt eine Plateau-Phase, in der nahezu alle Edukte in Produkte umgewandelt sind und es zu keinem weiteren Anstieg mehr kommt (Pfaffl 2001).

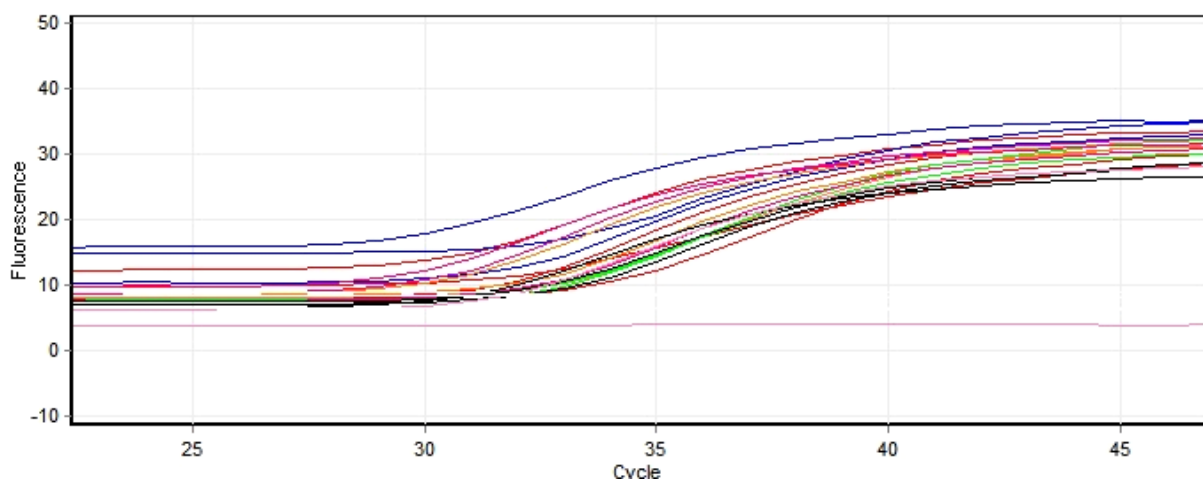


Abb. 8: Fluoreszenzkurve der qRT-PCR. Sigmoidale Fluoreszenzkurve der miR-182 mit exponentiellem Anstieg zwischen dem 30. und 40. Zyklus.

Stufe	Zeit	Temperatur	Ziel
Initiale PCR-Aktivierungsstufe	15 min	95 °C	Aktivierung der DNA Polymerase
3-Stufen-Zyklus	15 s	94 °C	Denaturieren von cDNA und Primer
	30 s	55 °C	Anlagerung der Primer
	30 s	70 °C	Elongation komplementärer miRNA
Zyklenanzahl	50 Zyklen		Amplifikation
Schmelzkurven-Generierung	90 s	57 °C	Vorbereitung
	je 3 s	57 °C → 95 °C, 0,5 °C Schritte	Schmelzkurvenanalyse

Tab. 11: Zyklusprotokoll für Rotor Gene 6000. Entsprechend dem Protokoll aus dem PCR-Handbuch von QIAGEN 2009.

Zur Ermittlung des Ct-Wertes wird ein Grenzwert (*threshold*) der Fluoreszenzaktivität festgelegt, der am Anfang des Anstieges liegt. Er lag in unserm Fall bei 0,1 *Norm. Fluoro.* (*normalized fluoreszenz*). Um alle Messungen miteinander vergleichen zu können, wurde immer derselbe *Threshold* verwendet (Abb. 9).

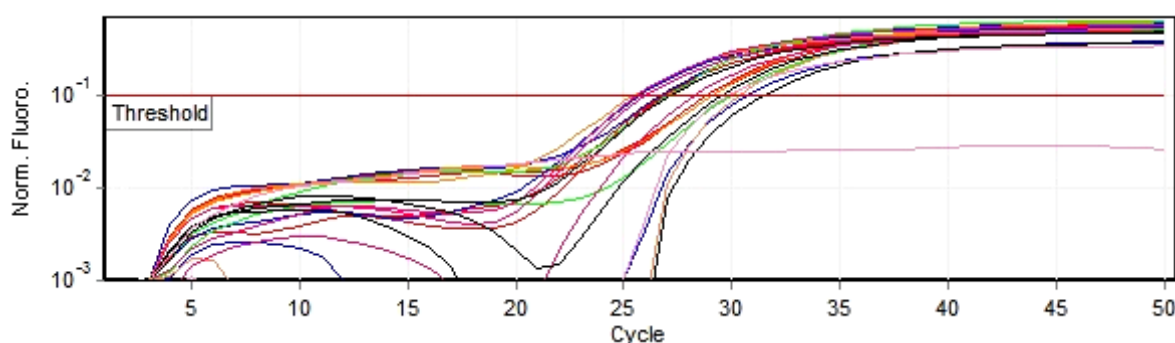


Abb. 9: Normalisierte Fluoreszenzkurve der qRT-PCR. Darstellung der Fluoreszenzkurve für miR-152 nach Normalisierung. Die rote Linie markiert den Grenzwert von 0,1 *Norm.Fluoro* (*normalised fluoreszenz*). Die Ct-Werte wurden an dem Schnittpunkt der roten Linie mit den Fluoreszenzkurven abgelesen.

4.6.6 Schmelzkurvenanalyse

Zur Detektion eventuell vorhandener unspezifischer Produkte oder Primer-Dimere schloss sich an der qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse an. Dabei wird die

Temperatur schrittweise ($\Delta 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) von $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöht. Bei niedrigen Temperaturen sind alle PCR-Produkte doppelsträngig und der Farbstoff kann binden. Ist die Schmelztemperatur T_m des PCR-Produktes erreicht, zerfällt der Doppelstrang und der Farbstoff löst sich. Die Fluoreszenz fällt plötzlich ab (dargestellt als *Peak* [erste Ableitung] in der Abbildung 10). Da die Primer-Dimere einen niedrigeren Schmelzpunkt haben, würde es zu einem verfrühten *Peak* kommen. Unspezifische Primer-Produkte führen zu einem unregelmäßigem *Peak* oder gar einem Plateau.

Die in diesem Experiment verwendeten PCR-Ansätze zeigten nur einen *Peak* an der spezifischen T_m . Dieser spezifische Schmelzpunkt lag je nach verwendeter miRNA zwischen $75 - 77\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der *Peak* der mitgeführten gemixten Template-Probe aller miRNA-Primer deckte sich in allen Fällen mit denen der einzelnen miRNA-Primer. Damit können die Bildung unspezifischer Produkte und Primer-Dimer als vernachlässigbar angesehen werden.

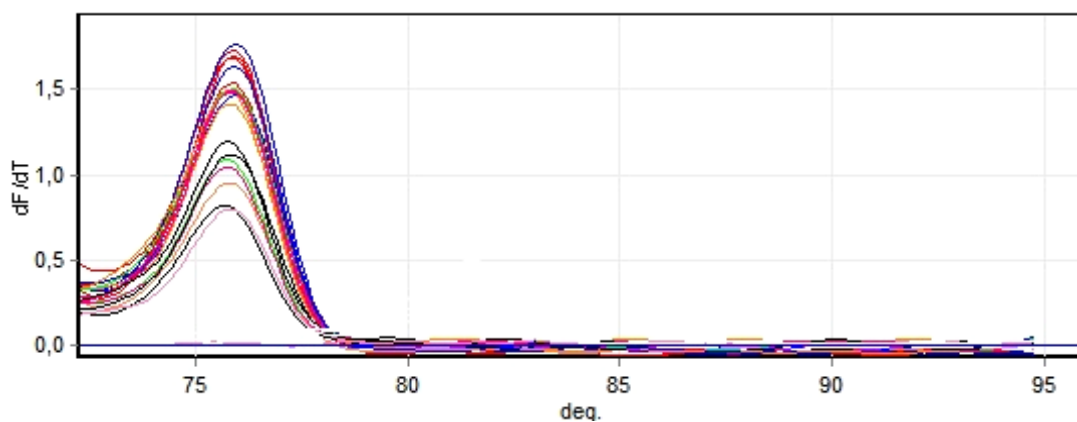


Abb. 10: Schmelzkurve der qRT-PCR. Dargestellt ist die erste Ableitung der Funktion. Damit stellt sich der plötzliche Fluoreszenzabfall als *Peak* dar. Es ist nur ein deutlich abgrenzbarer *Peak* bei ca. $76\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu sehen. Beispielhaft dargestellt an der miR-182

4.6.7 Referenzgenanalyse

Referenzgene bezeichnen Gene, die ständig in den Zellen exprimiert werden und zur Aufrechterhaltung grundlegender Zellfunktionen erforderlich sind. Ihr Expressionsmuster darf sich unter experimentellen Bedingungen und vorzugsweise zwischen verschiedenen Geweben nicht verändern. Sie stellen somit einen internen Vergleichswert für die relative Quantifizierung der Genexpressionsdaten dar (Thellin et al. 1999, Foss et al. 1998). Da gezeigt wurde, dass abhängig von dem experimentellen *Setting* ein Referenzgen auch beachtlichen Regulationen unterliegen kann, sollten mindestens drei Referenzgene mitgeführt werden (Tricarico et al. 2002, Thellin et al. 1999). Je heterogener das Gewebepanel, desto mehr Referenzgene sollten in den Normalisierungsprozess eingebunden werden (Vandesompele et al. 2002). Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich murine Leukozyten untersucht wurden, beschränkten wir uns auf drei Referenzgene.

QIAGEN *Technologies* schlägt hierfür eine Reihe von Referenzgenen vor, die eine fast 100% Amplifikationseffizienz besitzen und in den drei Spezies (Mensch, Ratte, Maus) homologe Sequenzen aufweisen. Hieraus wurden drei Referenzgene ausgewählt, mit denen regelmäßig an der Einrichtung gearbeitet wurde. Im Einzelnen betraf es die snRNAs RNU5A und RNU6B und die snoRNA SCARNA17. Um die ausgewählten Referenzgene auf ihre Stabilität hin zu überprüfen, wurden die Excel-basierenden *Softwares* *geNorm* (Version 2002) und *Normfinder* (Version 20) angewendet.

Beides stellen mathematische Modelle zur Berechnung der Stabilität der Referenzgene dar. Sie eliminieren solange minderstabile Transkripte, bis die beiden stabilsten Transkripte in dem vorgegeben experimentellen Setting auswählbar sind. Aus ihren Effizienzen wird dann das geometrische Mittel gebildet und zur relativen Quantifizierung der untersuchten miRNAs verwendet. *GeNorm* errechnet einen Expressionsstabilitätswert *M* aus der paarweisen Abweichung des Transkripts von allen anderen Transkripten. Das Transkript mit dem höchsten *M*-Wert wird eliminiert und die Berechnung erneut durchgeführt, bis die beiden Transkripte mit dem niedrigsten *M*-Wert übrig bleiben. Ausgegangen wird hierbei davon, dass keine Koregulation vorliegt (Vandesompele et al 2002). *Normfinder* berücksichtigt zusätzlich Expressionsvariationen innerhalb von Subgruppen (z.B. Probanden- vs.

Kontrollgruppe). Damit wird das mathematische Modell weniger anfällig für Koregulationen (Andersen et al 2004). Für beide Modelle benötigt man die relativen Expressionswerte (W_r), die nach der komparativen Ct-Methode aus den Ct-Werten errechnet werden.

$$W_r = E_{\text{Referenz}}^{-\Delta t_{\text{Kontrolle-Probe}}}$$

Die Primereffizienz des Referenzgens (E_{ref}) in der Basis wird zum Exponenten aus der Differenz der Ct-Werte Kontrolle minus Probe gesetzt. Die Kontrolle entspricht hierbei dem arithmetischen Mittel der Ct-Werte der 4 Monate alten *Sham*-Mäuse, während die Probe dem Ct-Wert des jeweiligen Zielgens entspricht. Anschließend wird aus den W_r der beiden stabilsten Gene das geometrische Mittel gebildet.

4.6.8 Normalisierung der Genexpressionsdaten

Genexpressionslevels können durch die absolute Menge an RNA quantifiziert werden. Das setzt aber eine korrekte Messung voraus ohne unmittelbare Bezugsgröße. Ein heute überwiegend genutzter alternativer Weg das Genexpressionsniveau zu normalisieren, ist die relative Quantifizierung. Das Expressionslevel des Zielgens wird dabei in Relation zu dem Expressionslevel der Referenzgene beschrieben. Dies hat den Vorteil, dass auch Daten von verschiedenen Experimenten und Gruppen direkt verglichen werden können. In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung der Genexpression nach der Methode von Pfaffl zur Datenanalyse heran gezogen (Pfaffl 2001).

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{-\Delta t_{\text{Zielgen (Kontrolle-Probe)}}}}{E_{\text{Referenzgen}}^{-\Delta t_{\text{Referenzgen (Kontrolle-Probe)}}}}$$

Das Zielgen wird mit dem geometrischen Mittel der beiden besten Referenzgene verglichen. Dadurch können mögliche Abweichungen oder Ausreißer besser kontrolliert werden (Vandesompele et al 2002). Damit lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob das Genexpressionsniveau des Zielgens hoch- oder runter reguliert bzw. im Vergleich zum Referenzgen unverändert geblieben ist. Das Referenzgen sollte idealerweise auch unter dem experimentellen Setting ein unverändertes Genexpressionsmuster zeigen.

Der Nenner der Gleichung entspricht dem im Abschnitt 4.6.7. berechneten geometrischen Mittel der Referenzgene. Im Zähler wird die aus der Standardkurve des jeweiligen Zielgens errechnete Effizienz zu dem Exponenten aus der Differenz der Ct-Werte Kontrolle minus Probe gestellt. Der Kontroll-Ct-Wert entspricht hierbei dem auch bei den Referenzgenen verwendeten arithmetischen Mittel der Ct-Werte der 4 Monate alten *Sham*-Gruppe. Der Ct-Wert der Probe entspricht dem jeweiligen Ct-Wert des untersuchten Zielgens.

Zur übersichtlicheren Darstellung der Daten wurden die errechneten Genexpressionsverhältnisse \log_2 -transformiert. Ein positiver Wert entspricht einer Hochregulation, ein negativer Wert hingegen einer Herabregulation. Entsprechend werden die Daten im Ergebnisteil als \log_2 -Fold Changes (FC) beschrieben. Ein \log_2 FC von 1 bedeutet in dieser Berechnung eine zweifache Erhöhung der Genexpressionsrate und bildet den Grenzwert, ab dem die Genexpressionsveränderung als relevant angenommen wurde.

4.7 Statistische Auswertung

Die Erfassung und Ordnung der Daten wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramm *Excel (Microsoft)* vorgenommen. Zunächst wurden die relativ quantifizierten Genexpressionsdaten auf Normalverteilung in drei Schritten überprüft.

- Grafische Überprüfung mit Wahrscheinlichkeitsnetz (QQ-Plot), Histogramm und Boxplot
- Vergleich der Kennzahlen
- Test auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk Test (Shapiro und Wilk, 1965).

Der Shapiro-Wilk Test für Normalverteilung gilt als der stärkste Test für Stichproben < 50 (Seier 2002), was auf die Daten der vorliegenden Untersuchung zutrifft. Bei diesem Test geht die Nullhypothese H_0 davon aus, dass eine Normalverteilung der Grundgesamtheit vorliegt. Sie wird abgelehnt, wenn der p-Wert des Tests kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau α von 0,05 ist.

Überprüft wurden alle Werte der jeweiligen Altersgruppe. Bis auf die Gruppe der 24 Monate alten PCI-Mäuse musste die Nullhypothese der Normalverteilung abgelehnt werden (Tab. 12). Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde nicht berücksichtigt, da er bei niedrigen Stichproben unzuverlässige Ergebnisse liefert. Die grafische Überprüfung und der Vergleich der Kennzahlen zeigten ebenfalls keine Normalverteilung.

Tests auf Normalverteilung						
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Statistik	Anzahl	Signifikanz	Statistik	Anzahl	Signifikanz
PCI_4	,203	40	,000	,798	40	,000
PCI_12	,133	30	,183	,886	30	,004
PCI_24	,145	30	,107	,947	30	,136
Sham_4	,156	30	,059	,906	30	,012
Sham_12	,191	20	,053	,832	20	,003
Sham_24	,193	30	,006	,788	30	,000

Tab. 12: Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung. Bis auf die Gruppe PCI_24 musste die Nullhypothese der Normalverteilung abgelehnt werden. Der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung ist bei niedrigen Stichproben sehr anfällig. Seine Ergebnisse wurden nicht berücksichtigt. PCI = Untersuchergruppe; Sham = Kontrollgruppe; 4, 12, 24 = Alter der Mäuse in Monaten.

Im weiteren Verlauf wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test angewandt. Dieser Homogenitätstest überprüft, ob zwei unabhängige Verteilungen A und B derselben Grundgesamtheit angehören. Verglichen wurden die unterschiedlichen Altersstufen gegeneinander sowie die Untersuchungsgruppe gegen die Kontrollgruppe. Auf der Ebene der Genexpressionsprofile der einzelnen miRNAs waren die Falldaten zu gering um statistische Signifikanzen zu zeigen. Hier wurden die Ergebnisse deskriptiv beschrieben. Sämtliche statistische Analysen wurden mit dem Programm SPSS 19 (IBM Corporation, Ethningen, Deutschland) durchgeführt. Das Signifikanzniveau α wurde als $< 0,05$ definiert.

Im Ergebnisteil werden die zehn selektierten miRNAs im Vergleich der PCI- und der *Sham*-Altersstufen untereinander analysiert. Der Behandlungseffekt wurde in einem gemeinsamen Diagramm aller PCI- und *Sham*-Gruppen dargestellt. Genutzt wurde hierfür ein „*Dot-Density-Plot*“ mit den dazugehörigen Boxplots der Werte. Das Signifikanzniveau wurde mit integriert und signifikante Unterschiede durch „*“ markiert. In einem zweiten Schritt schloss sich die Analyse der einzelnen Ziel-miRNAs grafisch in einem Punkte-Diagramm an. Es folgten der Vergleich der jeweiligen PCI-Altersgruppe mit ihrer *Sham*-Gruppe und der Vergleich der unterschiedlichen PCI- und *Sham*-Altersstufen untereinander. Die Daten wurden deskriptiv ausgewertet.

Alle Grafiken wurden mit dem Programm *Sigmaplot Version 12.0* (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Referenzgenanalyse

Den Ausführungen in Abschnitt 4.6.7. folgend, wurden aus den drei Referenzgenen die zwei stabilsten ausgewählt. Sowohl im Normfinder als auch in geNorm wurde SCARNA17 als das instabilste Gen identifiziert und eliminiert (Tab. 13).

Normfinder	Gen Name	Stability value	geNorm	Gen Name	Expressionsstabilitätswert M
	RNU5A	0,573		RNU5A	0,931
	RNU6B	1,396		RNU6B	1,024
	SCARNA17	1,916		SCARNA17	1,184

Tab. 13: Ergebnis der Referenzgenanalyse. SCARNA17 hatte sowohl bei *Normfinder* als auch bei *geNorm* den instabilsten Wert und wurde eliminiert.

Aus den relativen Expressionswerten beider Gene wurde nun das geometrische Mittel gebildet (Tab. 14).

5.2 Microarray Analyse

Die Ergebnisse wurden, wie in Abschnitt 4.4.2. beschrieben, dargestellt. Zur Auswertung wurden die normalisierten Daten genutzt.

5.2.1 Venn-Diagramm-Analyse

Dargestellt sind alle differenziert exprimierten miRNA-Transkripte, deren Expressionslevel sich zwischen zwei Alterstufen um das Vierfache unterscheidet, was bei den log₂-transformierten Daten einem *Fold Change* (FC) > 2 entspricht. Dabei wurden die Alterstufen 4 gegen 12 Monate, 4 gegen 24 Monate und 12 gegen 24 Monate verglichen.

Maus	Gruppe	RNU5A	RNU6B	Geomittel
M2	PCI 4 Monate	0,3031640664241	0,1937548477358	0,242362348
M4		0,2738202658579	0,4207474813721	0,339424789
M7		0,4017087356475	0,2527645802892	0,31864987
M8		0,7902999319104	0,2431519568949	0,438363975
M10	Sham 4 Monate	0,7762288907690	2,0739742500227	1,268809967
M11		3,7495362208829	2,0970768448489	2,80411583
M13		0,3437895845966	0,2300503213780	0,281227496
M14	PCI 12 Monate	1,1184932037412	0,4648580858981	0,721069074
M19		4,3290707784482	1,7084848147773	2,719586676
M20		0,6927495289798	0,2082207371345	0,379795758
M23	Sham 12 Monate	2,7135573444412	1,7958107022381	2,207495259
M25		1,0854998809347	0,5643033474624	0,782656512
M27	PCI 24 Monate	1,8386226317603	0,9657070398589	1,332505467
M30		4,9981791615820	2,7357599291929	3,697812633
M31		6,5440098462068	3,1247106218942	4,52196164
M34	Sham 24 Monate	0,7267448288018	0,3017810574353	0,468313808
M36		3,9571633506958	1,6435112291568	2,550223991
M37		2,1355534641504	0,8269735282544	1,328926703

Tab. 14: Relative Quantitäten und geometrisches Mittel. Relative Expressionswerte der beiden Gene RNU5A und RNU6B. Aus den Expressionswerten wurde das geometrische Mittel gebildet. Die erste Spalte enthält die Mausproben entsprechend ihrer Nummerierung.

Die Abbildung 11 gibt das Venn-Diagramm der PCI-Gruppen wieder. Insgesamt sind $xyz = 324$ Gene differenziert exprimiert. Während im Vergleich der gerade geschlechtsreifen (4 Monate) Mäuse gegenüber den adulten (12 Monate) und senilen (24 Monate) Mäusen $x = 250$, respektive $y = 294$ Gene mit einem $FC > 2$ identifiziert werden konnten, sind es im Vergleich der adulten gegen die senilen Mäuse nur $z = 109$ Gene. 173 Gene sind in beiden Vergleichen der gerade geschlechtsreifen Mäuse gegen die anderen Gruppen differenziert exprimiert.

Venn-Diagramm PCI-Gruppen

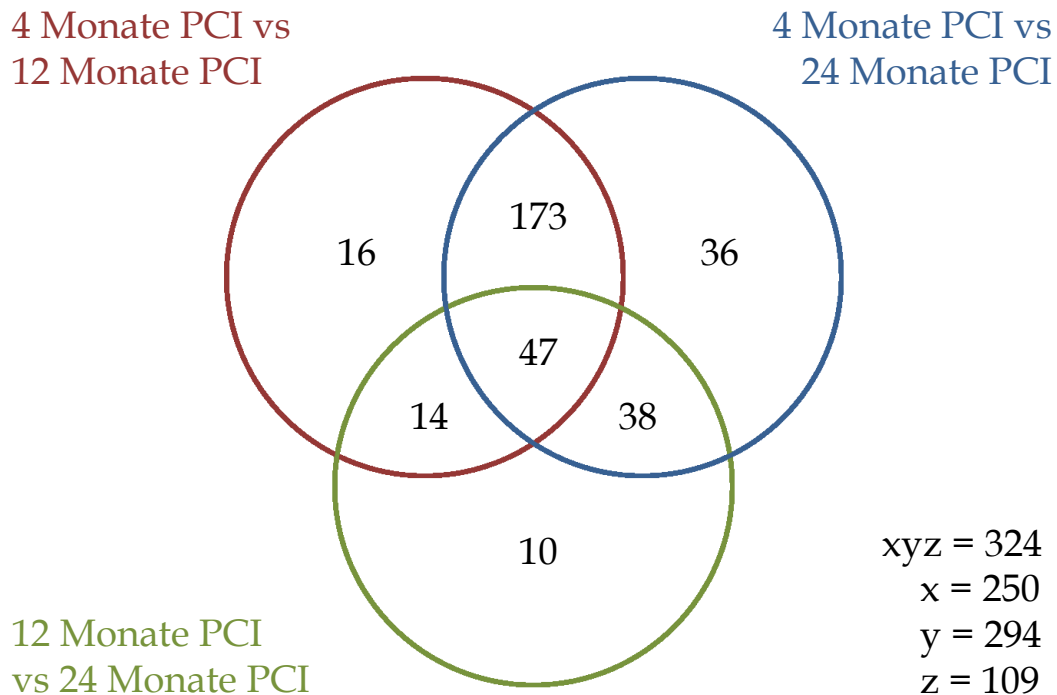


Abb. 11: Venn-Diagramm der PCI-Gruppen. Aufgetragen sind die zwischen den Altersstufen differenziert exprimierten Gene. Zwischen den gerade geschlechtsreifen Mäusen und den anderen beiden Gruppen sind zwei- bis dreimal so viele Gene differenziert exprimiert als zwischen den adulten und den senilen Mäusen. Xyz sind alle differenziert exprimierten Gene: x die zwischen 4 und 12 Monaten, y die zwischen 4 und 24 Monaten und z die zwischen 12 und 24 Monaten.

Im Venn-Diagramm der *Sham*-Gruppen zeigt die Abbildung 12 ein ähnliches Bild. Bei insgesamt $xyz = 381$ differenziert exprimierten Genen waren im Vergleich der 4 Monate alten Mäuse zu den 12 und 24 Monate alten Mäusen $x = 295$, respektive $y = 321$ Gene mit einem $FC > 2$ differenziert exprimiert. Im Vergleich der adulten gegen die senilen Mäuse hingegen nur $z = 98$ Gene. Auch hier war mit 218 eine große Anzahl an Genen in beiden Vergleichen der gerade geschlechtsreifen Mäuse gegen die anderen Gruppen in ihrem Expressionsniveau verändert.

Venn-Diagramm *Sham*-Gruppen

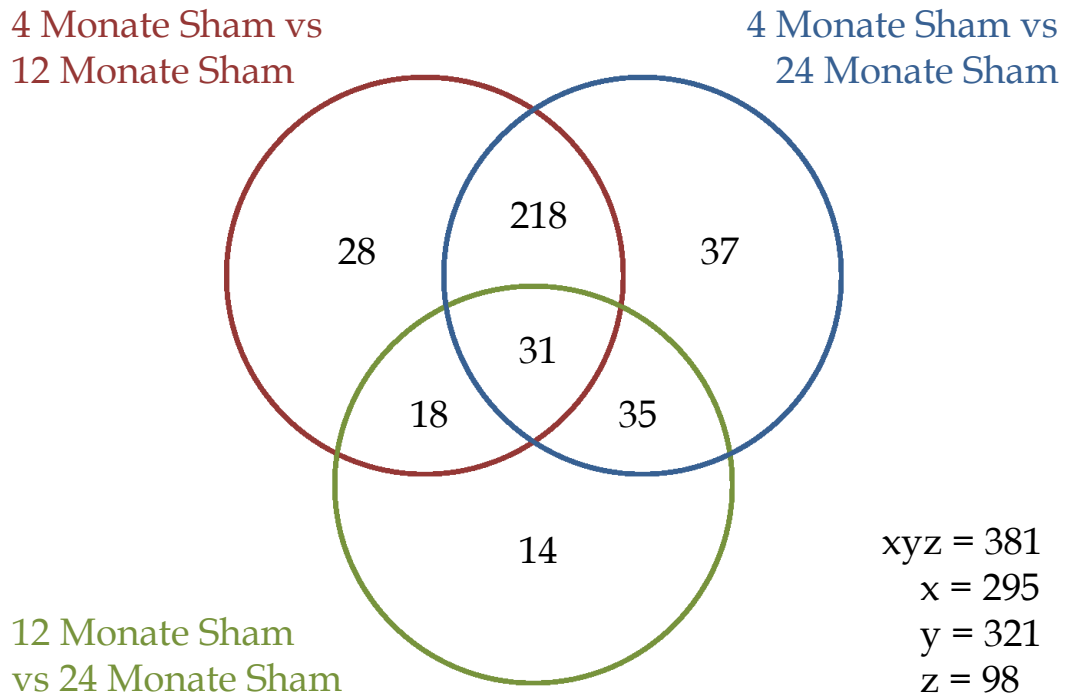


Abb. 12: Venn-Diagramm der *Sham*-Gruppen. Aufgetragen sind die zwischen den Altersstufen differenziert exprimierten Gene. Zwischen den gerade geschlechtsreifen Mäusen und den anderen beiden Gruppen sind zwei- bis dreimal so viele Gene differenziert exprimiert als zwischen den adulten und den senilen Mäusen. Xyz sind alle differenziert exprimierten Gene: x die zwischen 4 und 12 Monaten, y die zwischen 4 und 24 Monaten und z die zwischen 12 und 24 Monaten.

Der Behandlungseffekt wurde in der Abbildung 13 visualisiert. Aufgetragen sind diesmal jeweils der Vergleich der entsprechenden Altersstufen von PCI- und *Sham*-Gruppe gegeneinander. Im Vergleich der gerade geschlechtsreifen PCI-Mäuse waren $x = 166$ Gene gegenüber der *Sham*-Gruppe mit einem $FC > 2$ differenziert exprimiert. Bei den adulten Mäusen waren nur noch 103 Gene, bei den senilen Mäusen 75 Gene zwischen der PCI- und der *Sham*-Gruppe mit einem $FC > 2$ differenziert exprimiert. Insgesamt waren $xyz = 269$ Gene differenziert exprimiert.

Venn-Diagramm Behandlungseffekt PCI vs. *Sham*

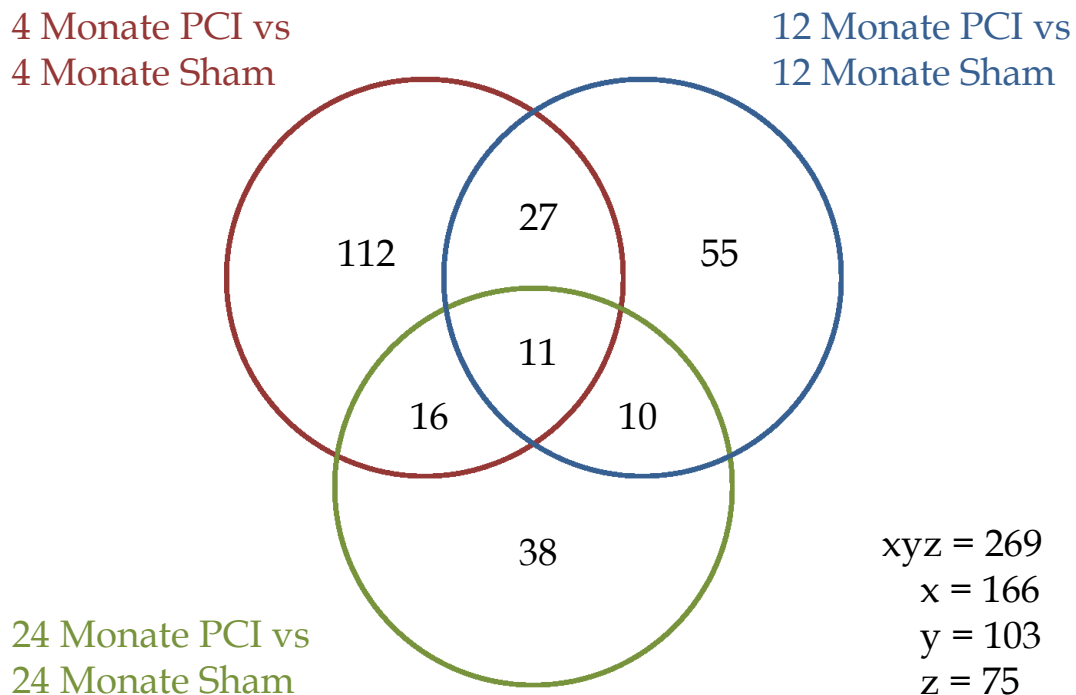


Abb. 13: Venn-Diagramm Behandlungseffekt PCI vs. *Sham*-Gruppe. Aufgetragen sind die zwischen den Behandlungsgruppen differenziert exprimierten Gene. Zwischen den Behandlungsgruppen der gerade geschlechtsreifen Mäuse sind ca. zweimal so viele Gene differenziert exprimiert wie zwischen den Behandlungsgruppen der adulten und der senilen Mäuse. Xyz sind alle differenziert exprimierten Gene: x die zwischen 4 Monaten PCI vs. *Sham*, y die zwischen 12 Monaten PCI vs. *Sham* und z die zwischen 24 Monaten PCI vs. *Sham*.

5.2.2 Hierarchische Clusteranalyse

Die Clusteranalyse berücksichtigte alle differenziert exprimierten miRNAs mit einem $FC > 2$. Die einzelnen miRNAs wurden entsprechend ihrer Ähnlichkeit den vorher festgelegten Clusterzentren zugeordnet. Anhand der Ausprägung dieser Clusterzentren konnten nun die einzelnen PCI- und *Sham*-Gruppen dieser Arbeit verglichen werden.

Die Abbildung 14 gibt den Vergleich der PCI-Gruppen untereinander wieder. Da im *Microarray* Versuch pro Altersstufe zwei Mausproben untersucht wurden, konnten insgesamt sechs Proben ausgewertet werden. Drei Clusterzentren wurden vorher festgelegt. Wie im Dendrogramm zu erkennen ist, ist das Genexpressionsmuster der gerade geschlechtsreifen Mäuse ähnlich. Es unterscheidet sich aber von dem der

anderen beiden Altersstufen. Das Genexpressionsmuster der adulten und senilen Mäuse wird als ähnlich eingestuft. Trotzdem wurden sie nochmals in Untergruppen geteilt. Abweichend von den Altersstufen ist die Probe einer der 12 Monate alten Mäuse zwar der der 24 Monate alten Mäuse ähnlicher als der ihres Altersgenossen, wird aber noch mal im Dendrogramm separiert dargestellt.

Clusteranalyse: miRNA-Genexpressionsprofil der PCI-Gruppen

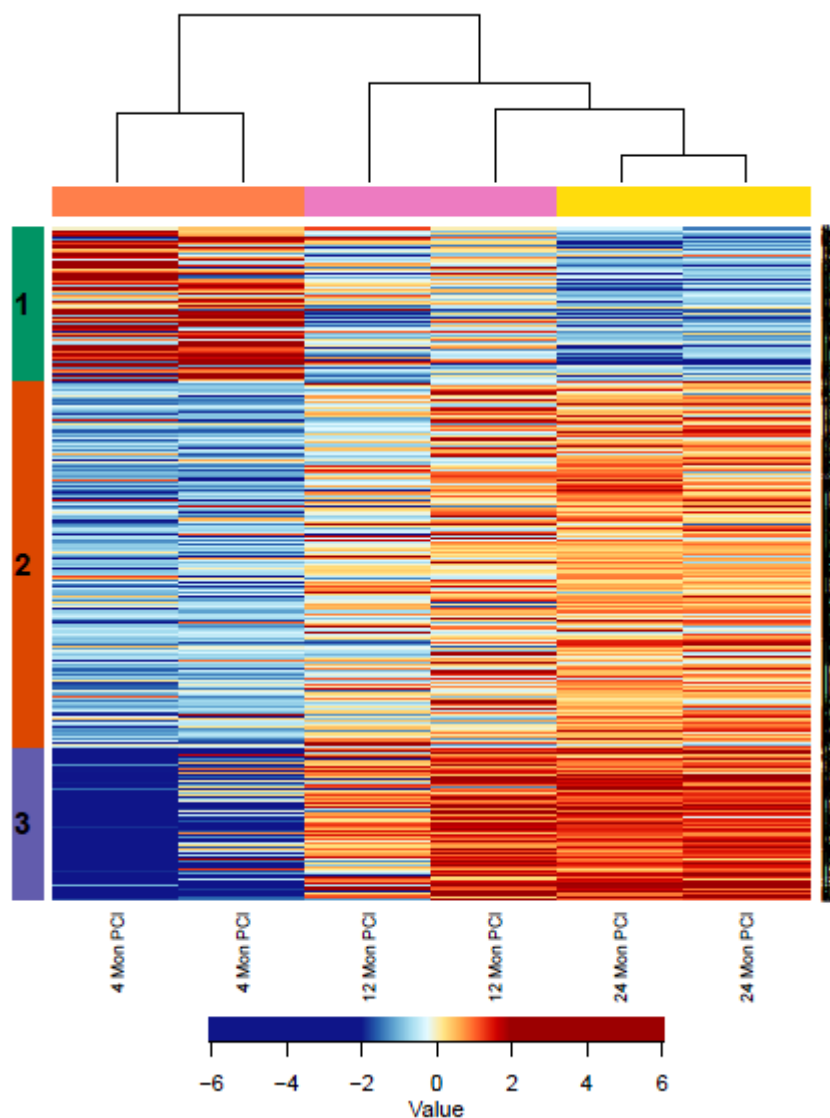


Abb. 14: Clusteranalyse der PCI-Gruppen mit Dendrogramm. Drei Clusterzentren wurden zuvor festgelegt und die Gene entsprechend ihrer Ähnlichkeit den Zentren zugeteilt. Das Genexpressionsniveau der gerade geschlechtsreifen Mäuse ist ähnlich. Es unterscheidet sich aber von dem der adulten und senilen Mäuse. Das Genexpressionsniveau der adulten und senilen Mäuse ist prinzipiell ebenfalls als ähnlich einzustufen, lässt aber die Bildung weiterer Subgruppen zu. Mon = Monate, Value = FC minus Expressions-Mittelwert aller Gene.

Die Abbildung 15 bildet den Vergleich der *Sham*-Gruppen gegeneinander ab. Auch von den *Sham*-Gruppen wurden pro Altersstufe zwei Proben untersucht. Es wurden sechs Clusterzentren festgelegt. Das Ergebnis ist mit dem der PCI-Gruppen vergleichbar. Die gerade geschlechtsreifen Mäuse sind sich ähnlich, werden aber im Dendrogramm von den anderen Altersstufen separiert. Die adulten und senilen Proben werden als ähnlich deklariert, wobei die Bildung weiterer Subgruppen im Dendrogramm wiedergegeben wird. Eine Abhängigkeit vom Alter in der Unterteilung lässt sich nicht nachweisen. Eine 12 Monate und eine 24 Monate alte Mausprobe sind sich untereinander ähnlicher als sie es gegenüber ihren Altersgenossen sind.

Die Abbildung 16 gibt den Behandlungseffekt wieder. Untersucht wurden die Ähnlichkeiten zwischen den PCI-Gruppen und den *Sham*-Gruppen in Abhängigkeit vom Behandlungsschema und dem Alter der Mäuse. Zwei Clusterzentren wurden vorher festgelegt. Die gerade geschlechtsreifen Mäuse werden als ähnlich erkannt und im Dendrogramm von den anderen Altersstufen separiert. Zusätzlich wird diese Gruppe von Mäusen entsprechend ihrem Behandlungsschema noch in zwei Subgruppen geteilt. Die Proben der anderen beiden Altersgruppen werden unter einem Ast zusammengefasst und somit als ähnlich gekennzeichnet. Sie teilen sich in multiple Subgruppen auf, mit nur bedingtem Bezug zu Alter oder Behandlungsschema. Unabhängig davon ob sie zur *Sham*- oder zur PCI-Gruppe gehören, sind sich die adulten Mäuse im Vergleich zu den senilen Mäusen untereinander generell ähnlicher. Eine Ausnahme bildet die eine 12-monatige *Sham*-Probe, rechts an vorletzter Stelle im Dendrogramm.

Clusteranalyse: miRNA-Genexpressionsprofil der *Sham*-Gruppen

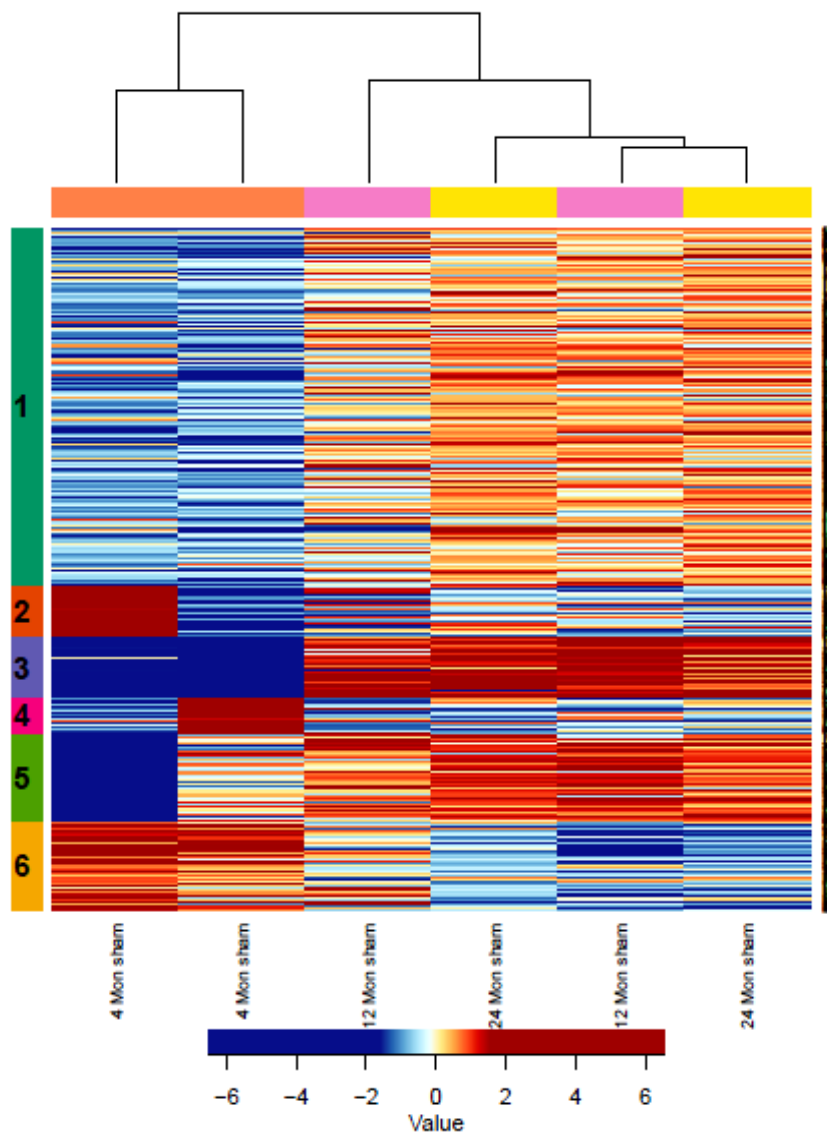


Abb. 15: Clusteranalyse der *Sham*-Gruppen mit Dendrogramm. Sechs Clusterzentren wurden im Vorfeld festgelegt und die Transkripte entsprechend ihrer Ähnlichkeit den Zentren zugeteilt. Das Genexpressionsniveau innerhalb der Gruppe der gerade geschlechtsreifen Mäuse ist ähnlich, unterscheidet sich aber von dem der adulten und senilen Mäuse. Das Genexpressionsniveau der adulten und senilen Mäuse ist prinzipiell ebenfalls ähnlich, wobei die Bildung weiterer Subgruppen erkennbar ist. Mon = Monate, Value = FC minus Expressions-Mittelwert aller Gene.

Clusteranalyse Behandlungseffekt PCI vs. *Sham*

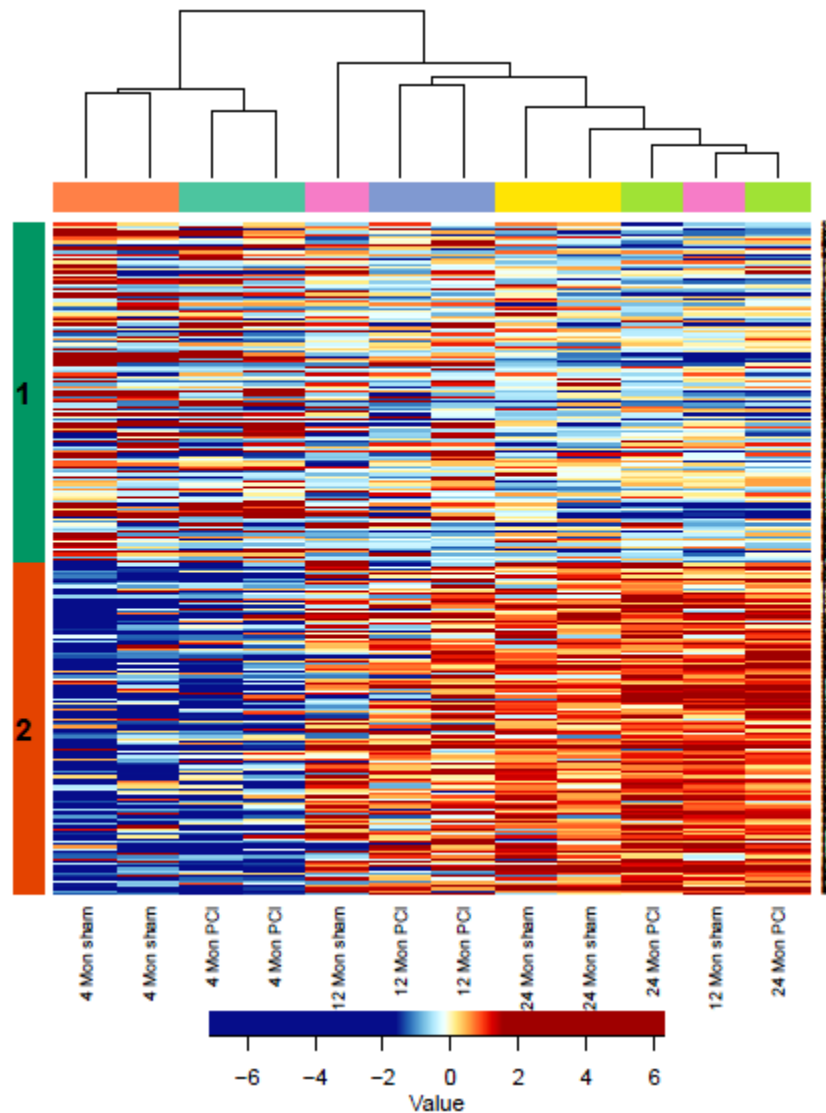


Abb. 16: Clusteranalyse Behandlungseffekt PCI vs *Sham*-Gruppen mit Dendrogramm. Im Voraus wurden zwei Clusterzentren festgelegt und die Gene entsprechend ihrer Ähnlichkeit den Zentren zugeteilt. Das Genexpressionsniveau der gerade geschlechtsreifen Mäuse ist ähnlich, unterscheidet sich aber von dem der adulten und senilen Mäuse. Unter den gerade geschlechtsreifen Mäusen wird die PCI- von der *Sham*-Gruppe getrennt. Das Genexpressionsniveau der reifen und senilen Mäuse ist prinzipiell ähnlich allerdings unter der Bildung multipler Subgruppen. Es ist nicht möglich einen klaren Bezug zwischen Alter oder Behandlungsschema herzustellen. Mon = Monate, Value = FC minus Expressions-Mittelwert aller Gene.

5.3 qRT-PCR Genexpressionsanalyse

Die \log_2 transformierten Genexpressionsdaten der zehn ausgewählten miRNAs aus der qRT-PCR (Tab. 15) wurden, wie in Abschnitt 4.6.8. beschrieben, berechnet. Die Analyse der Daten erfolgte in zwei Schritten. Die \log_2 FCs aller zehn miRNAs je Altersstufe wurden zusammengefasst. Für die PCI- und die *Sham*-Altersstufen

wurden zwei separierte *Dot-Density-Plots* angelegt. Zusätzlich sind im Diagramm die *Boxplots* der einzelnen Altersgruppen abgebildet sowie der p-Wert aus dem statistischen Vergleich (Mann-Whitney-U Test) der Altersstufen gegeneinander. In einem dritten *Dot-Density-Plot* wurde der Behandlungseffekt untersucht. Hierbei wurden die PCI-Proben mit den gleichaltrigen *Sham*-Proben verglichen.

	miR-9	miR-106a	miR-152	miR-27a	miR-27b	miR-148a	miR-330	miR-182	miR-181d	miR-497
PCI 4 mon	-0,333	1,245	-0,825	-0,235	-0,016	1,385	0,513	3,014	1,166	-0,146
PCI 4 mon	1,413	1,973	2,789	1,669	1,814	2,999	1,625	2,618	1,293	2,412
PCI 4 mon	0,746	0,765	-0,010	-0,170	1,037	0,880	0,979	0,695	0,967	-0,769
PCI 4 mon	0,861	0,741	0,390	0,260	0,082	0,660	0,574	2,509	1,669	0,838
Sham 4 mon	0,967	1,522	1,127	1,427	0,770	1,047	0,933	0,510	1,440	1,117
Sham 4 mon	-0,508	-1,177	-1,338	-1,418	-0,981	-0,888	-2,052	-0,992	-0,662	-2,534
Sham 4 mon	-0,460	-0,345	0,210	-0,010	0,209	-0,160	1,119	0,481	-0,779	1,417
PCI 12 mon	0,527	-0,318	-0,558	-1,148	-0,758	-0,628	-0,775	0,385	0,569	-1,252
PCI 12 mon	1,419	0,935	1,967	1,557	0,903	0,577	-0,211	0,735	1,210	0,105
PCI 12 mon	0,615	0,132	1,047	-0,123	-0,626	0,867	-0,101	1,937	1,024	-0,248
Sham 12	-2,055	-1,382	-0,542	1,008	-0,561	-0,352	-0,946	-0,791	0,065	-0,043
Sham 12	0,879	-0,826	-0,346	-1,116	-1,165	-1,626	-0,107	0,983	0,025	-1,863
PCI 24 mon	-1,414	-1,072	-0,454	-0,454	-0,346	-0,714	-0,486	0,206	0,021	-1,241
PCI 24 mon	0,644	-1,093	0,163	-0,497	0,039	0,663	-1,362	0,542	-0,413	-2,441
PCI 24 mon	-0,788	-0,311	0,043	-0,147	-0,372	-0,417	-1,532	0,154	-0,730	-1,183
Sham 24	2,361	0,399	2,354	0,654	0,574	0,884	0,012	1,348	1,671	-0,858
Sham 24	1,215	-0,348	0,859	0,309	-0,881	0,619	0,055	0,470	0,185	-0,788
Sham 24	-3,686	-1,978	-0,660	-1,380	-2,471	-1,890	-1,337	0,165	-1,147	-2,038

Tab. 15: Log₂ transformierte Genexpressionsdaten aller 10 miRNA. Unterteilt nach Alter und experimenteller Gruppe (PCI vs *Sham*). Mon = Monat.

Die Genexpressions-Daten jeder der zehn miRNAs wurden separat in einem Punktediagramm dargestellt. Auf Grund der kleinen Datenmengen blieben statistische Tests allerdings erfolglos.

5.3.1 Analyse aller miRNAs im *Dot-Density-Plot*

Die Abbildung 17 gibt den Vergleich der PCI-Gruppen gegeneinander wider. Eingetragen wurden die \log_2FC s aller zehn miRNAs je Altersstufe. Abhängig von der Probengröße ergaben sich so für die 4-monatige PCI-Gruppe 40 Werte, für die 12- und 24-monatigen PCI-Gruppen je 30 Werte. Anhand der Punkteverteilung ist ein Gefälle von links nach rechts erkennbar, das auch am Median der Boxplots zu sehen ist. Die 4-monatige PCI-Gruppe liegt bei einem \log_2FC von durchschnittlich 1, während die Werte der 24-monatigen Gruppe bei -0,4 rangieren. Der Mann-Whitney-U Test weist nach, dass ein signifikanter Unterschied im Genexpressionsniveau zwischen allen Gruppen besteht.

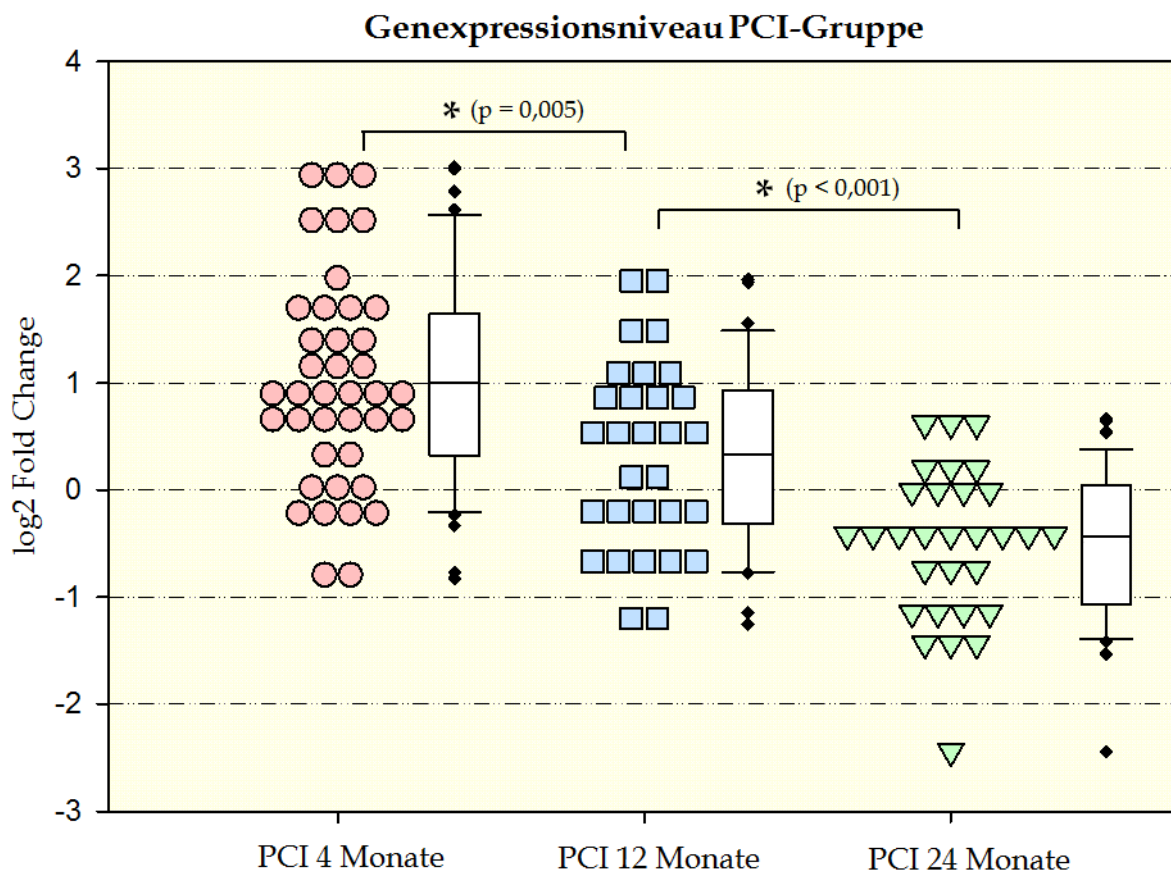


Abb. 17: Dot-Density-Plot der PCI-Gruppen. Dot-Density-Plot der Genexpressionsdaten aller zehn miRNAs der PCI-Gruppen mit den dazu gehörigen Boxplots und dem Signifikanzniveau p nach dem Mann-Whitney-U Test. Die Altersstufen unterscheiden sich in ihrem Expressionsniveau signifikant voneinander. * = Signifikant.

Die Abbildung 18 veranschaulicht den Vergleich der *Sham*-Gruppen gegeneinander. Eingetragen wurden die $\log_2\text{FCs}$ aller zehn miRNAs je Altersstufe. Abhängig von der Probengröße ergaben sich so für die 12-monatige *Sham*-Gruppe 20 Werte, für die 4- bzw. 24-monatigen PCI-Gruppen je 30 Werte. Die Punkte verteilen sich je nach Altersstufe dichter oder gestreckter um den FC von „0“. Zwischen den einzelnen Altersstufen konnte kein signifikanter Unterschied berechnet werden.

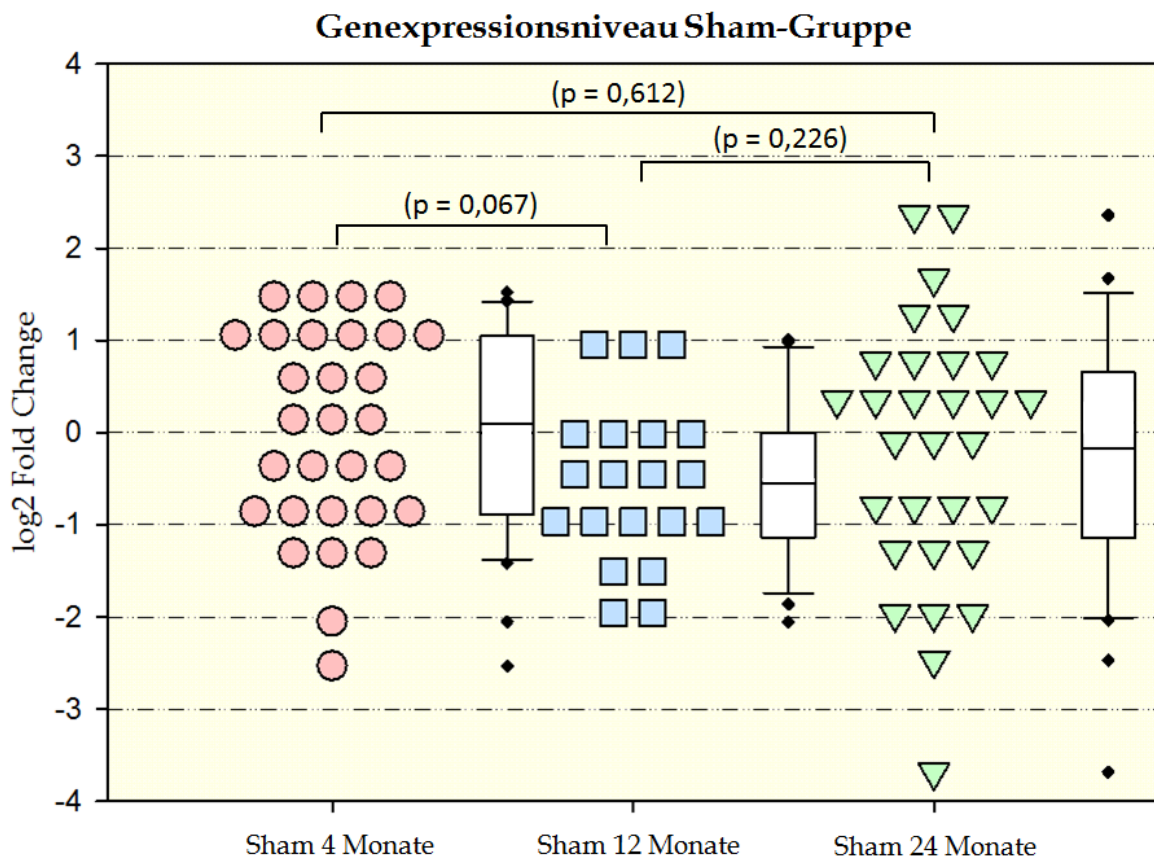


Abb. 18: Dot-Density-Plot der Sham-Gruppen. Dot-Density-Plot der Genexpressionsdaten aller zehn miRNAs der *Sham*-Gruppen mit den dazu gehörigen Boxplots und dem Signifikanzniveau p nach dem Mann-Whitney-U Test. Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Altersstufen nachgewiesen werden.

Die Abbildung 19 demonstriert den Behandlungseffekt. Eingetragen wurden die $\log_2\text{FCs}$ aller zehn miRNAs je Altersstufe entsprechend der oben beschriebenen Probengrößen. In der Altersstufe der 4 Monate alten Mäuse lässt sich ein signifikanter Behandlungseffekt zwischen der PCI- und der *Sham*-Gruppe nachweisen. Die Genexpressionsdaten der PCI-Gruppe sind gegenüber denen der *Sham*-Gruppe hoch reguliert. Auch in der 12-monatigen Altersstufe besteht ein signifikanter Unterschied. Allerdings auch dadurch begünstigt, dass der Median der

Sham-Gruppe im negativen FC-Bereich liegt. Zwischen den Gruppen der 24 Monate alten Mäuse besteht kein signifikanter Unterschied in der Genexpression. Ein nachweisbarer Unterschied würde auf einen Behandlungseffekt hindeuten.

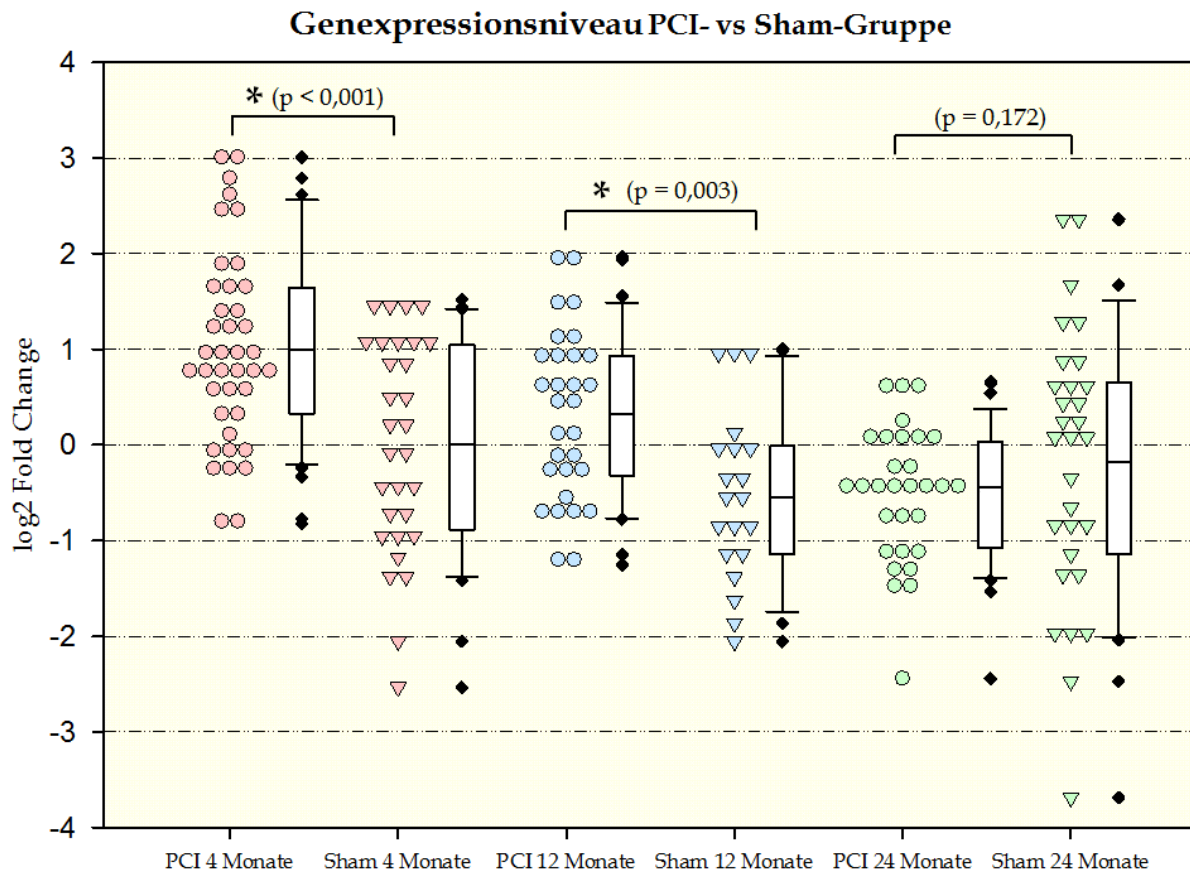


Abb. 19: Dot-Density-Plot Behandlungseffekt PCI vs. Sham. Dot-Density-Plot der Genexpressionsdaten aller zehn miRNAs der PCI- und Sham-Gruppen mit den dazu gehörigen Boxplots und dem Signifikanzniveau p nach dem Mann-Whitney-U Test. Zwischen der PCI- und der Sham-Gruppe der 4 Monate alten und 12 Monate alten Mäuse besteht ein signifikanter Unterschied. Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den 24 Monate alten Mäusen nachgewiesen werden. * = Signifikant.

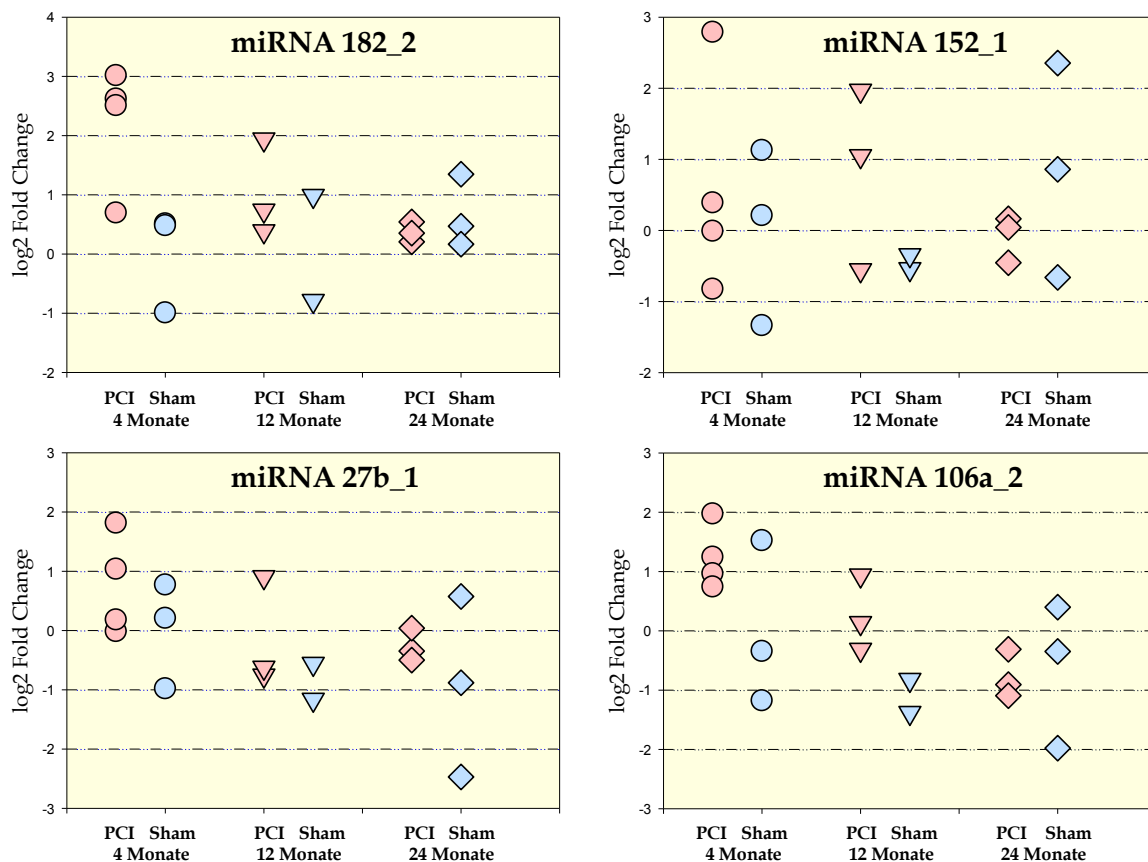
5.3.2 Deskriptive Analyse einzelner miRNAs im Punktediagramm

Die Abbildung 20 repräsentiert alle selektierten miRNAs in einzelnen Punktediagrammen. Die PCI- und die Sham-Gruppen wurden nach ihrer Altersstufe sortiert und nebeneinander abgebildet. Aufgrund der geringen Probengrößen je Altersstufe konnten statistische Test nicht angewendet werden, so dass die Auswertung ausschließlich deskriptiv erfolgte. Das Genexpressionsmuster der miRNA hängt in der PCI-Gruppe vom Alter der Mäuse ab. Während die 4 Monate alte PCI-Gruppe mit einer Hochregulation auf die Sepsisinduktion reagiert, ist bei

den 24 Monate alten Mäusen keine Genexpressionsveränderung mehr nachweisbar. Insgesamt lässt sich bei allen selektierten miRNAs ein tendenzieller Abfall der \log_2FC s von links nach rechts im Diagramm erkennen.

Am deutlichsten zeigt die miR-182 den Unterschied im Genexpressionsniveau nach Sepsisinduktion gegenüber den Kontroll-Mäusen auf. Drei weitere miRNAs sind ebenfalls mit einem $\log_2FC > 1$ differenziert exprimiert. Dies sind miR-148, miR-181d und miR-106a. Zwei miRNAs, MiR-9 und miR-330, liegen bei einem \log_2FC von 1 und überschreiten somit den Grenzwert nicht deutlich. Die miRNAs MiR-152, miR-27a, miR-27b und miR-497 lassen keine relevante Genexpressionsveränderung nach Sepsisinduktion erkennen. In der *Sham*-Gruppe verändert sich das Genexpressionsniveau über die Altersstufen nicht. Die Werte sind mehr oder weniger stark um den \log_2FC von „0“ gestreut.

Punktediagramme der selektierten miRNAs



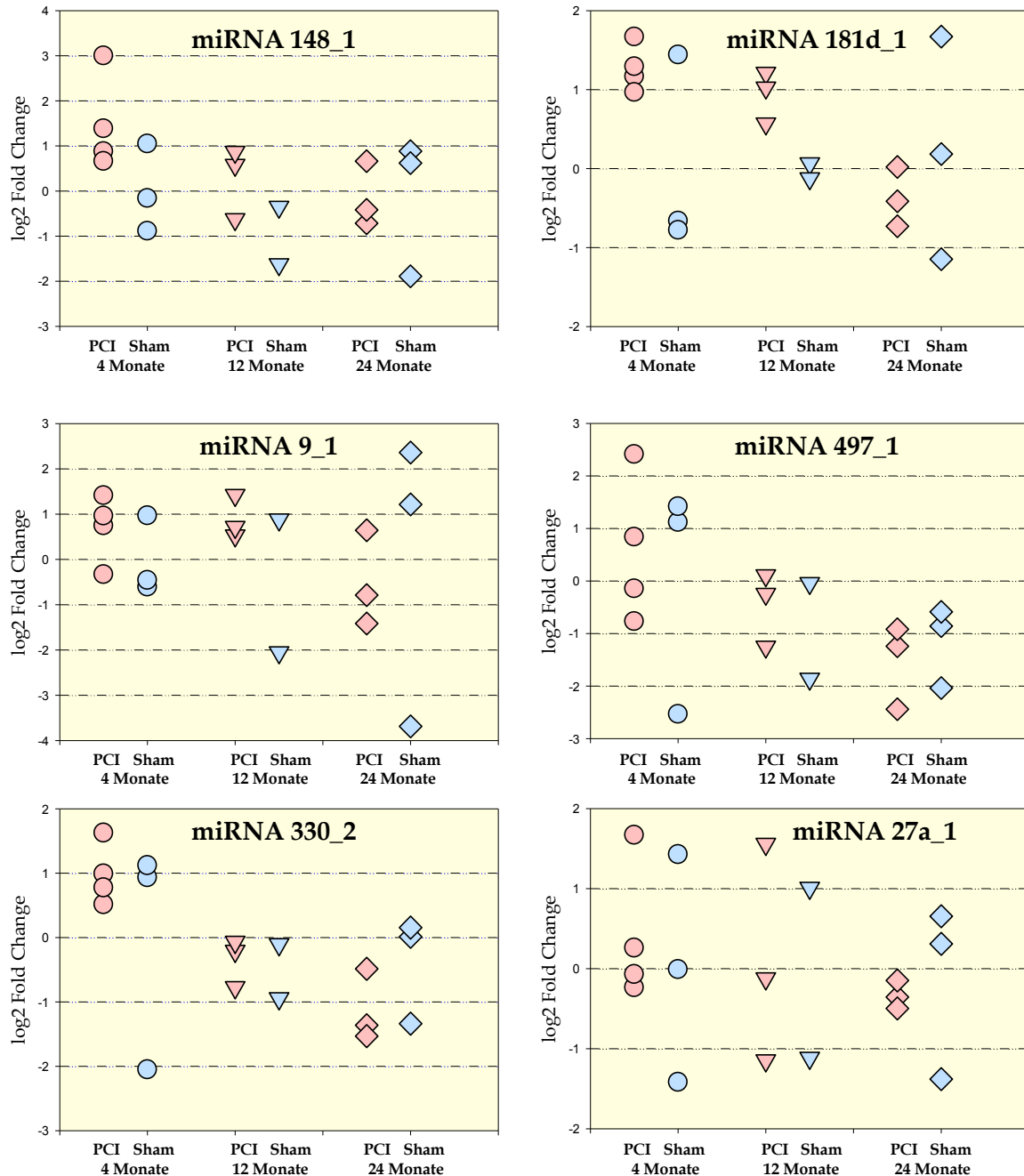


Abb. 20: Punktediagramm der zehn selektierten miRNA. Je miRNA wurde ein Punktediagramm erstellt. Die Proben wurden nach dem Alter sortiert und nebeneinander dargestellt. Bei den PCI-Gruppen ist tendenziell ein Abfall der Expressionsdaten von den jungen Mäusen hin zu den alten Mäusen zu beobachten. Die Werte der Sham-Gruppe streuen um den Nullpunkt.

6 Diskussion

Die symptomatische und antibiotische Behandlung der Sepsis und des konsekutiven Organversagens hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert. Viele der bei einer Sepsis ablaufenden pathophysiologischen Prozesse wurden identifiziert und beschrieben. Keiner davon konnte jedoch bisher erfolgreich in kausative oder adjunktive Behandlungsverfahren umgesetzt werden, so dass immer noch keine spezifische Therapieoption zur Anwendung kommt. Cohen et al. (2011) stellten deshalb die etwas provokante Frage: *„Wie viele Sepsisstudien müssen noch fehlschlagen, bevor wir eine komplett andere Herangehensweise in Betracht ziehen?“*

Eine mögliche therapeutische Strategie ist dabei die Modulation der überschießenden Wirtsreaktion und die Wiederherstellung der inflammatorischen Homöostase. Sowohl von der diagnostischen als auch der therapeutischen Perspektive stellt der Phänotyp der zirkulierenden Leukozyten ein hochinteressantes *Target* dar. Xiao et al. (2011) konnten zeigen, dass das Transkriptom in zirkulierenden Leukozyten nach einem schweren Trauma, einer Verbrennung oder einer experimentellen Endotoxininjektion, unabhängig von der Inflammutationsursache, einen sogenannten Gen-Sturm erlebt, an dem Transkripte für 80% aller Zellfunktionen beteiligt sind. Dieser Gen-Sturm trat wenige Stunden nach Beginn der systemischen Inflammation auf und hielt unabhängig von weiteren Komplikationen für einige Tage bis Wochen an. Dies macht das Identifizieren eines einzelnen Wirkstoffs für die Therapie der komplexen immunologischen Vorgänge bei einer Sepsis eher unwahrscheinlich und macht das Scheitern bisheriger *target*-orientierter Strategien verständlich (Xiao et al. 2011). Eine weitere wesentliche Ursache für das Scheitern therapeutischer Sepsisstudien ist auch die ineffiziente Stratifizierung der Studienpatienten (Graf et al. 2002).

In der Onkologie hat die Entwicklung spezifischer Therapien für streng definierte Patientengruppen allerdings viel Erfolg gebracht. Dieser Ansatz könnte sich grundsätzlich auch in Bezug auf die Sepsis bewähren. Carlet et al. (2008) schlagen deshalb auch vor, „Sepsis“ nicht als einen Krankheitskomplex zu verstehen, sondern die verschiedenen Entitäten der Sepsis differenziert zu betrachten. Die Wirtsreaktion

eines 18-jährigen Patienten mit akuter Meningokokken-Sepsis wird vermutlich anders ausgeprägt sein als bei einem 70-jährigen Patienten mit einer nosokomial erworbenen Pneumonie oder postoperativen Wundinfektion (Cohen et al. 2011). Ungeachtet dessen wird vielfach aber nur die eine „*magic bullet*“ zur Therapie der Sepsis gesucht.

Beispielsweise trug der Benefit antiinflammatorischer Therapien in präklinischen Sepsis Tiermodellen zwar nicht allgemein zur Verbesserung der Überlebenszeit bei septischen Patienten bei (Eichacker et al. 2002). In der spezifischen Subgruppe, die eine vergleichbare Krankheitsschwere und Mortalität wie die Versuchstiere aufwies, verbesserte sich aber dennoch die Überlebenszeit nach antiinflammatorischer Therapie. Die septischen Patienten mit einer geringeren Krankheitsschwere hingegen profitierten nicht davon, beziehungsweise ihnen wurde durch die Therapie sogar Schaden zugefügt (Eichacker et al. 2002).

Mäuse sind gegenüber Infektionen relativ resistent, während Menschen sehr sensitiv reagieren (Warrens et al. 2010). Schon bei leichter Sepsis kommt es bei Letzteren zu einer starken Genexpressionsänderung. Die Widerstandsfähigkeit der Mäuse indes verhindert eine maximale Transkriptionssteigerung immunrelevanter Gene. Eine größere Heterogenität der Genexpressionsänderung ist die Folge (Seok et al. 2013). Um Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können, muss sichergestellt werden, dass der Schweregrad und der Krankheitsverlauf der systemischen Infektion und des konsekutiven Organversagens bei Mausmodellen dem der Patienten auf der ITS in größtmöglicher Annäherung entspricht.

In dieser Arbeit wird das Konzept der Subgruppenbildung von Carlet et al. (2008) aufgegriffen und die Auswirkung der Sepsis auf die miRNA-Genexpression in verschiedenen murinen Altersgruppen untersucht. Die überwiegende Mehrheit der Sepsis-Experimente wird an 3-4 Monate alten Mäusen durchgeführt. 12 Monate alte Mäuse repräsentieren den *circa* 40-jährigen Menschen (Turnbull et al. 2003) und stellen einen ersten großen Alterssprung dar. Der greise Mensch wird durch die 24 Monate alten Mäuse repräsentiert. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass sich das miRNA-Genexpressionsmuster mit dem Alter signifikant verändert. Bei den

senilen Mäusen ist die miRNA-Genexpressionsveränderung nach Induktion einer Sepsis schwächer ausgeprägt als bei den gerade geschlechtsreifen Versuchstieren. Dass die miRNA in der Dysregulation des Immunsystems und dem Alterungsprozess eine wichtige Rolle spielt, ist bekannt (Gorospe und Abdelmohsen 2011, Hackl et al. 2010). Das Datenspektrum hinsichtlich der Beteiligung der miRNA an der Wirtsreaktion der Sepsis dagegen ist spärlich. Die vorliegende Arbeit trägt zur Verkleinerung dieser Wissenslücke bei.

Wertung der Modelle

Kein Modell der intra-abdominellen Infektion spiegelt in allen Einzelheiten den klinischen Verlauf wieder. Einflüsse wie Umweltfaktoren, genetischer *Background* und Multimorbidität sind so komplex, dass die Übertragbarkeit von murinen Modellen auf den Menschen grundsätzlich mit zahlreichen Unsicherheiten behaftet ist (Chen et al. 2010). Bis heute gibt es lediglich eine Studie, die systematisch überprüft hat, ob murine Modell humane inflammatorische Krankheiten auf molekularer Ebene hinreichend widerspiegeln: Seok et al. (2013) konnten zwar zeigen, dass die Wirtsreaktion des Menschen auf verschiedene akute inflammatorische Krankheiten auf der Genebene ähnlich ist. Mit der Genexpressionsänderung in zirkulierenden Leukozyten in murinen LPS-Modellen deckt sie sich aber nicht. Der hohe Standardisierungsgrad der Modelle zur polymikrobiellen Sepsis, der wichtig ist, um den Einfluss von Störgrößen in Untersuchungsgruppen zu minimieren und die Ergebnisse verschiedener Studien über die einzelnen Versuchsgruppen vergleichbar zu machen, entspricht nicht der Heterogenität der klinischen Realität. Ausgewählt wurden für das Modell nur gesunde, männliche Tiere eines Inzucht-Stammes ohne Komorbiditäten, wie sie etwa in einer durchschnittlichen Bevölkerungsgruppe anzutreffen sind (Poli-de-Figueiredo et al. 2008). Einzig die Variabilität des Patientengutes in Bezug auf das Alter sollte systematisch untersucht werden.

Als ein weiterer Nachteil muriner Sepsismodelle wird oft das Fehlen einer antibiotischen und supportiven Therapie genannt, wie sie beispielsweise septische Patienten auf Intensivstationen erhalten. Dieser Mangel spielt in der vorliegenden Untersuchung wegen der Euthanasie der Mäuse innerhalb von 24 Stunden nach

Sepsisinduktion allerdings keine wesentliche Rolle. Diese Studie wurde als Pilotprojekt angelegt und dient ausschließlich der Grundlagenforschung. Über die Aufgabe der verschiedenen miRNAs sowie deren Wichtung in der Sepsis können nur begrenzt Aussagen gemacht werden. Dazu wären verschiedene Interventionen notwendig, die hemmend oder stimulierend auf die miRNAs einwirken. Das zu untersuchen, wäre ein lohnender Ansatz für weitergehende Forschungen.

Das in dieser Studie verwendete PCI-Modell zur Induktion einer polymikrobiellen Peritonitis weist durch die Verwendung einer Faecessuspension mit Gram-positiven und Gram-negativen Keime eine große Nähe zu klinischen Fragestellungen der Wirtsreaktion bei intraabdomineller Sepsis auf. Im Gegensatz zu anderen Modellen entspricht die Erregervielfalt der eingesetzten standardisierten humanen Stuhlproben weitestgehend der polymikrobiellen Infektion der sekundären Peritonitis bei Patienten (Stamme et al. 1999). Der hohe Standardisierungsgrad des PCI-Modells resultiert unter anderem aus der Tatsache, dass Aliquots der gepoolten Stuhlprobe über einen längeren Zeitraum konservierbar sind. Das ermöglicht die Verwendung der gleichen Faecessuspension in einer Vielzahl von Experimenten. Bakterien können viele Jahre eine Lagerung bei -80°C tolerieren (Acha et al. 2005, Dan et al. 1989). Allerdings war eine leichte Reduktion der Kolonie bildenden Einheiten je Millimeter (KBE/ml) Faecessuspension in einem späteren Versuch nachweisbar. Die Mortalitätsrate der Versuchstiere änderte sich jedoch nicht (Gonnert et al. 2011).

Wie bereits einleitend erwähnt, stehen die Leukozyten im Mittelpunkt der Wirtsreaktion einer Sepsis. Sie eignen sich daher besonders gut, um Änderungen im Genexpressionsmuster, unter anderem den der miRNAs, zu untersuchen. Obwohl die meisten aktivierten Leukozyten in das Gewebe einwandern, wurde in dieser Untersuchung für die Analyse des miRNA Profils auf zirkulierende Leukozyten zurückgegriffen. Sie haben den Vorteil, dass sie einfach zu gewinnen sind, einen hohen Standardisierungsgrad ermöglichen und in begrenztem Maße mit Versuchen an humanen zirkulierenden Leukozyten verglichen werden könnten. Die Gewinnung von aktivierten Gewebeleukozyten am Patienten ist klinisch sehr aufwändig, teuer und in der Routine nicht anwendbar. Insofern wurde in dieser

Arbeit auf das diagnostische Ausgangsmaterial der zirkulierenden Leukozyten zurückgegriffen.

Wertung der Methodik

Zur Genexpressionsanalyse wurden mit der *Microarray* Analyse und der qRT-PCR zwei unabhängige und komplementäre Verfahren eingesetzt. Die zuerst durchgeführte *Microarray* Analyse dient dem *Screening*, da sie hunderte bis tausende Gene simultan analysieren kann. Dieser Ansatz bietet die Chance, offen an ein Problem heran zu gehen und Zusammenhänge aufzudecken, die nicht von vornherein erwartet worden waren. Als hypothesengenerierende Methode reflektierte sie generelle Unterschiede in der miRNA-Genexpression der verschiedenen experimentellen Gruppen. Die nachgewiesenen Differenzen in der miRNA-Genexpression abhängig von der Sepsisinduktion und dem Alter bildeten dann die Grundlage nachfolgend aufgestellter Hypothesen.

Da die Fluoreszenzsignale des *Microarrays* von Experiment zu Experiment stark variieren können, sollten nur Vergleichsproben von einem einzigen Chip analysiert werden (Pedotti et al. 2008). Aus diesem Grund wurden aus jeder Versuchsgruppe zwei Mausproben ausgewählt. Die sechs verschiedenen Versuchsgruppen konnte so auf einem Chip mit 12 Reihen analysiert werden. Weiterhin muss in der *Microarray* Analyse eine gewisse Hintergrundfluoreszenz durch ein Reflektieren des Chip-Materials von der Gesamtfluoreszenz abgezogen werden. Dieses „Rauschen“ verwischt allerdings natürliche Unterschiede in schwachen Signalen. Hinsichtlich Genauigkeit und Detektionslimit ist die qRT-PCR der *Microarray* Analyse weit überlegen. In Bezug auf das (prä-)analytisches Qualitätskontrollmanagement ist sie, den MIAME Kriterien gemäß, das Verfahren der Wahl, um Gene, die in der *Microarray* Analyse Unterschiede aufweisen, weiter zu untersuchen (Brazma et al. 2001). Hypothesengetrieben konnte nun in der qRT-PCR das Genexpressionsmuster selektierter miRNAs analysiert werden. Der Vorteil hypothesengetriebener Experimente ist, dass sie zielgerichtet zu bestätigenden Ergebnissen führen. Sie sind zweckmäßig sofern, wie in dieser Arbeit, zu dem untersuchten Thema ausreichend Informationen vorliegen.

Als weiterer Punkt sollte die tatsächliche biologische Relevanz der Genexpressionsveränderung bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden. In der Literatur wird kein allgemein gültiger Grenzwert beschrieben, ab dem eine miRNA-Genexpressionsänderung für die Zelle und den Organismus als relevant betrachtet wird. Während einige Autoren ihre Ergebnisse ohne jeglichen Bezug zu einem Grenzwert auflisten, legen andere diesen mehr oder weniger willkürlich fest. Der am häufigsten in der Literatur anzutreffende Grenzwert liegt bei einer zweifachen Genexpressionsveränderung der miRNA. Das entspricht bei log₂-transformierten Daten einer Änderung von ± 1 (Schmidt et al. 2009, Vasilescu et al. 2009, Noren Hooten et al. 2010, Moore et al. 2012). Auch in dieser Untersuchung wurde ein log₂-Grenzwert von ± 1 als relevant angenommen.

Die vorliegende Pilotstudie basiert auf einer relativ geringen Anzahl an Versuchstieren und darauf beruhenden unabhängigen Experimenten. Das schränkt die statistische Analyse sowie die Interpretation der Ergebnisse ein. Um einen signifikanten Unterschied in der Genexpression zwischen den Altersgruppen der Versuchstiere nachzuweisen, eignete sie sich jedoch. In weiterführenden Studien zu diesem Thema sollte aber eine größere Anzahl von Versuchstieren zum Einsatz kommen.

Selektierte miRNA

Zur Selektion der sepsisrelevanten miRNAs wurde auf zehn *Pathways* fokussiert. Diese decken beispielhaft die wichtigsten, als derzeit relevant betrachteten Signaltransduktionswege einer Sepsis ab. Anhand der miRNA-Datenbank *DIANA microT4* wurde überprüft, welche miRNA eine Rolle in diesen *Pathways* spielen und wie relevant diese sind. Allerdings muss beachtet werden, dass die Identifikation der miRNA-Zielgene schwierig ist. Die meisten bioinformatischen Analysen benutzen zur Vorhersage der Ziel-mRNA die Sequenz der 3'-UTR der miRNA. Wie einleitend bereits beschrieben wurde, kann die Interaktion zwischen der miRNA und ihrer mRNA aber auch an anderen Stellen stattfinden. Ist die richtige Ziel-mRNA einmal identifiziert, muss diese aber noch lange keinen wesentlichen Effekt auf der Proteinebene haben. In endogenen miRNA *knockout*-Experimenten zeigt sich in

Mikroarray Analysen typischerweise eine zweifache Erhöhung der entsprechenden mRNA-Expression (Selbach et al. 2008). Expressionsänderungen *in vivo* sind aber sehr variabel und lassen auf eine komplexe Regulierung der mRNA-Expression schließen. Um verlässliche Daten über die Rolle von miRNAs in funktional wichtigen *Pathways* zu erhalten, sind *Antisense*- und Überexpressions-Assays erforderlich. *Antisense*-Arrays scheinen physiologisch relevanter zu sein. Sie inhibieren die Expression endogener miRNA und riskieren im Gegensatz zu Überexpressions-Assays keine *off-target* Effekte (O'Neill et al. 2011).

Die miRNA-Datenbanken zur Zielvorhersage werden beständig erweitert. Immer neue miRNA-Spezies werden hinzugefügt beziehungsweise fälschlicherweise gelistete miRNAs entfernt (Griffiths-Jones et al. 2008, mirBASE v19). Seit Beginn der Experimente dieser Arbeit im Jahre 2010 hat sich das Wissen um die miRNA beträchtlich erweitert, ist aber noch weit davon entfernt, als vollständig angesehen werden zu können.

Signaltransduktionswege

Die inflammatorische Wirtsreaktion ist eine stereotype Antwort des Körpers auf Gewebeschäden verschiedener Art (Muller 2009). Lösliche Mediatoren werden schnell zum Ort des Geschehens transportiert, gefolgt von einer Rekrutierung der Leukozyten. Am Ort der Inflammation beginnen die Leukozyten in einer Reihe von Adhäsionsprozessen an der endothelialen Gefäßwand entlang zu rollen, werden gebunden, durchdringen schließlich das Endothelium und wandern in das interstitielle Gewebe zum Ort der Inflammation (Muller 2003, Ley et al. 2007). Diese transendotheliale Migration (TEM) ist der „*point of no return*“ in der Wirtsreaktion auf eine Infektion (Muller 2007). Ganz wesentlich für diese Grundfunktion der leukozytären TEM sind Zell-Zellkontakte der Gruppen der *Adherens Junction*, der *Tight Junctions* und der *Focal Adhesions* (Gotsch et al. 1997, Zhao und Guan 2011, Ye et al. 2011, Utech et al. 2006). In diesen Zell-Zellkontakt Signaltransduktionswegen spielen von den zehn selektierten miRNAs besonders die miRNAs miR-330, miR-181d, miR-182 und miR-106a eine wichtige Rolle, womit sie direkt Einfluss auf die TEM der Leukozyten ausüben (Tab. 16).

Der Signaltransduktionsweg des T-Zell-Rezeptors (TCR) ist einer der bestdefinierten des Immunsystems (Sakaguchi et al. 2012). TCRs des adaptiven Immunsystems erkennen antigene Peptid-Fragmente, die ihnen über den Histokompatibilitätskomplex angeboten werden. Seine Komponenten – Protein Tyrosin Kinasen, Phosphatasen und Adaptorproteine – sind essentiell für die lymphozytäre Entwicklung und Funktion (Weiss und Littman 1994). Entscheidend beteiligt sind hier unter anderem die miRNAs miR-27a und miR-181d (Tab. 16).

MAP-Kinasen wirken ebenso wie Zytokin-Zytokin-Rezeptor-Interaktionen entscheidend mit bei der Regulation des Wachstums, der Differenzierung und der Funktion der Leukozyten (Karnitz und Abraham 1995, Pearson et al. 2001). Die pleiotropen Effekte der Zytokine werden durch verschiedene Rezeptortypen vermittelt. Sowohl Typ I als auch Typ II Zytokine und ihre Rezeptoren nutzen intrazellulär den Jak-Stat-Signaltransduktionsweg. Über diesen *Pathway* wird eine große Anzahl an Genen, die in die Wirtsreaktion auf eine Sepsis involviert sind, in ihrem Expressionsniveau beeinflusst (Leonard 1999, Leonard und Lin 2000). MAP-Kinasen wiederum werden durch eine Kaskade von mindestens drei Proteinkinasen aktiviert und sind Bestandteil vieler proinflammatorischer *Pathways* (Lewis et al. 1998, Gustin et al. 1998). Die miRNAs miR-106a, miR-27b, miR-9 und miR-330 sind in der Regulation dieser *Pathways* involviert (Tab. 16).

Ein ebenso ubiquitärer Bestandteil der Wirtsreaktion auf eine Sepsis sind die interzellulären Kanäle, die sogenannten *GAP-Junctions*. *Gap-Junction Pathways* modulieren wichtige immunologische Prozesse wie die Immunglobulin Sekretion und die Zytokin Produktion (Oviedo-Orta et al. 2001), die TEM der Leukozyten (Zahler et al. 2003), die Überkreuzpräsentation von Peptiden in aktivierten Monozyten (Neijssen et al. 2005) und die Immunsuppression durch regulatorische T-Zellen (Bopp et al. 2007). Die selektierten miRNAs MiR-182 und miR-330 sind am intensivsten an der Regulation der *GAP-Junction* beteiligt. (Tab. 16).

Signaltransduktionsweg	beteiligte miRNAs
<i>MAPK signaling pathway</i>	miR-106a, miR-27b, miR-497, miR-9
<i>T cell receptor signaling pathway</i>	miR-27a, miR-152, miR27b, miR-181d
<i>TGF-β signaling pathway</i>	miR-106a, miR-152, miR-148a
<i>GAP junction</i>	miR-182, miR-330
<i>Focal adhesion</i>	miR-106a, miR-148a, miR-9, miR-330, miR-497
<i>Adherens junction</i>	miR-181, miR-182, miR-106a
<i>Tight junction</i>	miR-330, miR-181d, miR-9
<i>Toll-like receptor signaling pathway</i>	miR-9, miR-181d
<i>Cytokine-cytokine receptor interaction</i>	miR-330, miR-106a, miR-182
<i>Apoptosis</i>	miR-181d

Tab. 16: Sepsisrelevante Signaltransduktionswege der Leukozyten. Entsprechend der Rangfolge in der miRNA Datenbank *DIANA microT4* wurden die, in der Regulation des jeweiligen sepsisrelevanten *Pathways*, wichtigsten miRNAs aufgelistet.

TGF- β hat autokrin und parakrin vor allem hemmende Funktionen auf das adaptive Immunsystem und kann durch natürliche Effektorzellen wie Makrophagen aktiviert oder gehemmt werden. Der *TGF- β signaling pathway* wirkt unter anderem direkt antiinflammatorisch auf TH1-Zellen (Li et al. 2006, Wrzesinski et al. 2007). Damit verhindert er ein Überschießen der Immunantwort auf die Sepsis (Ahmad et al. 1997). Besonders die miRNAs miR-106a und 146a sind an der Regulation dieses *Pathways* beteiligt (Tab. 16).

Die Wirtsreaktion auf eine Sepsis ist durch ineinander übergehende Phasen der Hyperinflammation und der Hypoinflammation gekennzeichnet (Hotchkiss und Karl 2003, Pinheiro-da Silva et al. 2006). Die Hypoinflammation stellt die anerge Phase des Organismus im Rahmen der Bekämpfung der Infektion dar und geht mit einer Apoptose der zirkulierenden Leukozyten einher (Hotchkiss et al. 1999). Eine überschießende Apoptose zirkulierender Leukozyten kann zu einem fulminanten und anhaltenden Lymphozytenverlust führen. Dieser mündet schließlich in einer Deaktivierung der Immunfunktion und damit verbunden zu einer höheren Mortalität der Sepsis (Le et al. 2002, Schröder et al. 2001). Darüber hinaus ist die

Apoptose für die Reifung in den primären und sekundären Lymphorganen von großer Bedeutung Rolle (Lopes-Carvalho und Kearney 2004). In den Signaltransduktionsprozessen der Apoptose greifen besonders die miR-181d und miR-182 ein (Tab. 16).

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören zu der Gruppe der *PRRs* (*pattern recognition receptors*) des angeborenen Immunsystems. Sie dienen der Erkennung von *PAMPs* (*pathogen associated molecular patterns*). *PAMPs* kommen ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vor (Shields et al 2011). Unterschiedliche TLRs können jeweils unterschiedliche *PAMPs* identifizieren. Abhängig davon, welcher TLR beteiligt ist, kommt es zu einer Transkriptionssteigerung verschiedener immunrelevanter Gene. Damit wird die Aktivierung des erworbenen Immunsystems eingeleitet und moduliert (Takeda und Akira 2005, O'Neill 2005). Durch die TLRs vermag das angeborene Abwehrsystem zwischen „selbst“ und „nicht selbst“ zu unterscheiden (Turvey und Hawn 2006). Die miR-9 und die miR-181d werden bei der Regulation des *TLR signaling pathways* hervorgehoben (Tab. 16).

MiRNA und Alter

Die Daten des *Microarray* Versuchs weisen behandlungs- und altersspezifische Unterschiede im Transkriptom der miRNAs nach. Das Alter der Tiere hat einen wesentlichen Einfluss auf deren Transkription. Wie aus der Tabelle 17 ersichtlich ist, verändert sich das Genexpressionsniveau der miRNAs in der Sham-Gruppe mit zunehmendem Alter. Der größte Unterschied besteht zwischen den gerade geschlechtsreifen und den senilen Mäusen. Hier sind dreimal soviel Gene mit einem $FC > 2$ differenziert exprimiert als zwischen den adulten und den senilen Mäusen. Die signifikante Abhängigkeit des Genexpressionsniveaus der miRNAs vom Alter der Mäuse wird auch durch andere Veröffentlichungen bestätigt (Li et al. 2009 (1), Maes et al. 2008 (1), Bates et al. 2010, Ibanez-Ventoso et al. 2006). Ebenso unterscheidet sich in der PCI-Gruppe das miRNA-Genexpressionsniveau der gerade geschlechtsreifen Mäuse signifikant von dem der adulten und senilen Mäuse unabhängig von einer Intervention. Auch zwischen den adulten und den senilen Mäusen gibt es in beiden Versuchsgruppen über hundert differenziert exprimierte miRNAs. Die Clusteranalyse der *Mikroarray* Versuche legt jedoch nahe, dass dieser

Unterschied nicht relevant ist. Beide Altersstufen wurden unter einem Ast des Dendrogramm zusammengefasst und somit als ähnlich klassifiziert (Abb. 21).

differenziert exprimierte miRNAs		differenziert exprimierte MiRNAs		differenziert exprimierte MiRNAs	
PCI 4 Monate vs 12 Monate	250	Sham 4 Monate vs 12 Monate	295	4 Monate PCI vs Sham	166
PCI 4 Monate vs 24 Monate	294	Sham 4 Monate vs 24 Monate	321	12 Monate PCI vs Sham	103
PCI 12 Monate vs 24 Monate	109	Sham 12 Monate vs 24 Monate	98	24 Monate PCI vs Sham	75
Σ aller MiRNAs	324	Σ aller MiRNAs	381	Σ aller MiRNAs	269

Tab. 17: Differenziert exprimierte MiRNAs aus der Venn-Diagramm Analyse. Anzahl der MiRNAs mit einem \log_2 -FC von > 2 . Vergleich der verschiedenen Altersgruppen gegeneinander. PCI = Untersucherguppe, Sham = Kontrollgruppe.

In der Missachtung dieser Alterskorrelation könnte eine der Ursachen für das wiederholte Scheitern vieler Wirkstoffstudien liegen. Was an jungen Mäusen erprobt wurde und erfolgversprechend zu sein schien, scheiterte bisher in über 30 Phase-3-Studien (Cohen et al. 2011). Am überwiegend älteren Patientengut auf der ITS konnte die Wirksamkeit der Therapien dann nicht mehr nachgewiesen werden. Einige Studien zeigten sogar signifikanten Schäden durch scheinbar erfolgversprechende neue Sepsistherapien (Lopez et al. 2004, Dellinger et al. 2009).

Die große Mehrheit der altersabhängigen miRNA scheint herabreguliert zu sein (Bartel 2009, Maes et al. 2008 (2), Bates et al. 2009, Li et al. 2009 (1)). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine Arbeitsgruppe um Noren Hooten. Sie untersuchte das miRNA-Profil in mononuklearen Zellen des Blutes. Im Vergleich zu den jungen Individuen waren bei den alten Individuen 144 miRNAs supprimiert und nur 21 erhöht (Noren Hooten et al. 2010). Als Ursache für den Funktionsverlust vieler miRNAs im Alter werden Transkriptionsrepression, Deletionen, Mutationen, epigenetisches Gen-Silencing oder aberrante miRNA Prozessierung diskutiert (Garzon et al. 2009, Liang et al. 2009).

Kürzlich veröffentlichte *Reviews* (siehe unten) listen eine Reihe von miRNAs auf, die in beiden Prozessen, dem der Alterung und dem der Inflammation, involviert sind. Bis heute wurde aber nur eine kleine Anzahl an Geweben und Organen von Mäusen und Menschen analysiert. Ob die Veränderungen in einzelnen Geweben oder Organen Rückschlüsse auf den ganzen Organismus zulassen, ist zumindest fraglich.

Im Alter kommt es zu einem zwei- bis vierfachen Anstieg inflammatorischer Mediatoren wie Zytokine und Akut-Phase-Proteine (Krabbe et al. 2004). Besonders die Zytokine IL-6, IL-1b, TNF- α , IL-10 sind im Inflammations- und Alterungsprozess involviert (Caruso et al. 2005, Candore et al. 2006, Rea et al. 2006). Der chronische Antigenstress im Zusammenhang mit dem genetischen Hintergrund des einzelnen Menschen scheint dabei die Hauptursache für den Prozess des *Inflamm-Agings* zu sein (Franceschi et al. 2000, De Martinis et al. 2005, Licastro et al. 2005). Die dysregulierte Funktion des Immunsystems beschleunigt ihrerseits den Alterungsprozess des Menschen (Goodwin 1995, Franceschi et al. 1995) und ist so eine der Ursachen für die erhöhte Sterblichkeit im Alter (Gill et al. 2001). Jiang et al. (2012) konnten zeigen, dass die fehlregulierte Expression von miR-146a im Alter zur Dysfunktion von Makrophagen führt. MiR-146a, ein negativer *Feedback*-Regulator der IL-1b und IL-6 Expression (Biswas und Lopez-Collazo 2009) ist in alten Mäusen überexprimiert, reagiert aber nicht auf eine LPS-Stimulation (Jiang et al. 2012). Die negative *Feedback*-Schleife zur Begrenzung inflammatorischer Mediatoren durch die miR-146a nach Infektion war in alten Mäusen unterbrochen.

Im Rahmen des *Inflamm-Aging* kommt es zu einem Umbau des adaptiven Immunsystems, besonders dem der T-Zell-Antwort (Grubeck-Loebenstein und Wick 2002). Die altersabhängige Reduktion des miR-92a Levels korreliert mit der reduzierten Anzahl an naiven CD8⁺ T-Lymphozyten (Ohyashiki et al. 2011). Hackl et al. (2010) zeigten, dass miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a in humanen Zellen inklusive der CD8⁺ T-Lymphozyten im Alter herunterreguliert waren. Als ein weiterer zentraler Regulator des Immunsystems erwies sich die miR-155 (Tili et al. 2009). Ein miR-155-Defizit in B-Lymphozyten führt zu einem fehlerhaften Antikörper-Isotypen-Wechsel sowie der fehlerhaften Differenzierung zu Plasmazellen (Thai et al. 2007). Die Herunterregulation vieler miRNAs im Alter spielt offenbar eine wichtige

Rolle im Verlaufe des *Inflamm-Agings*. Die meisten bisher untersuchten miRNAs mit Einfluss auf das Immunsystem scheinen eine übersteigerte Wirtsreaktion auf Infektionen zu verhindern. Mit der Repression der miRNA-Transkription im Alter fehlt ein negativer Feedback-Mechanismus in der Regulation inflammatorischer Mediatoren, was wiederum die permanente Aktivierung des Immunsystems im Alter fördert. Unstrittig ist, dass das Altern die miRNA Transkription beeinflusst. Was die Ursache dafür und was die Konsequenz daraus ist, kann aber noch nicht klar beantwortet werden.

Die genannten Beispiele zeigen, dass die veränderte Genexpression der miRNAs im Alter einen wesentlichen Einfluss auf die Dysregulation des Immunsystems hat. Auch bei Mäusen verändert sich das Genexpressionsmuster der miRNAs mit dem Alter. Unter besonderer Berücksichtigung des *Inflamm-Aging* wird es in der Zukunft unabdingbar sein, murine Sepsisexperimente an zumindest adulten Versuchstieren vorzunehmen um erfolgreich übertragbare Strategien zur Diagnostik und Therapie der Sepsis entwickeln zu können.

MiRNA und Sepsis

Das miRNA-Genexpressionsmuster ändert sich aber nicht nur auf Grund des Alters, sondern auch durch die Induktion einer Sepsis. Hierbei kommt es zu einer signifikanten Wirtsreaktion in den zirkulierenden Leukozyten auf der miRNA-Ebene. Die Daten aus dem *Microarray* Versuch allerdings zeigen, dass lediglich die gerade geschlechtsreifen Mäuse mit einer relevanten Hoch- bzw. Herunterregulation vieler miRNA-Transkripte auf eine Sepsis reagieren. Überraschenderweise ist dieser Effekt im Alter stark abgeschwächt. Schon bei den adulten Mäusen sind deutlich weniger Gene mit einem $\log_2FC > 2$ differenziert exprimiert und nochmals weniger Gene in der Gruppe der senilen Mäuse (Tab. 16). Die Clusteranalyse bestätigt diesen Effekt (Abb. 21). Sowohl in der PCI-, als auch in der Sham-Gruppe unterscheiden sich die gerade geschlechtsreifen Mäuse in ihrem miRNA Genexpressionsmuster von den älteren Versuchstieren. Nach Sepsisinduktion verändert sich das miRNA-Transkriptom der gerade geschlechtsreifen PCI-Mäuse im Gegensatz zu ihrer gleichaltrigen Sham-Gruppe. Bei den adulten und den senilen Mäusen gelingt eine klare Grenzziehung zwischen den Altersstufen und den experimentellen Gruppen

nicht mehr. Die einzelnen Mausproben sind in ihrem miRNA-Genexpressionsmuster innerhalb einer Altersstufe ähnlicher, als innerhalb einer experimentellen Gruppe (PCI vs Sham). Das Alter scheint hier einen größeren Einfluss auf die miRNA-Transkripte zu haben, als die Induktion einer Sepsis (Abb. 21)

Dendrogramme der Clusteranalyse der Micorarray-Versuche

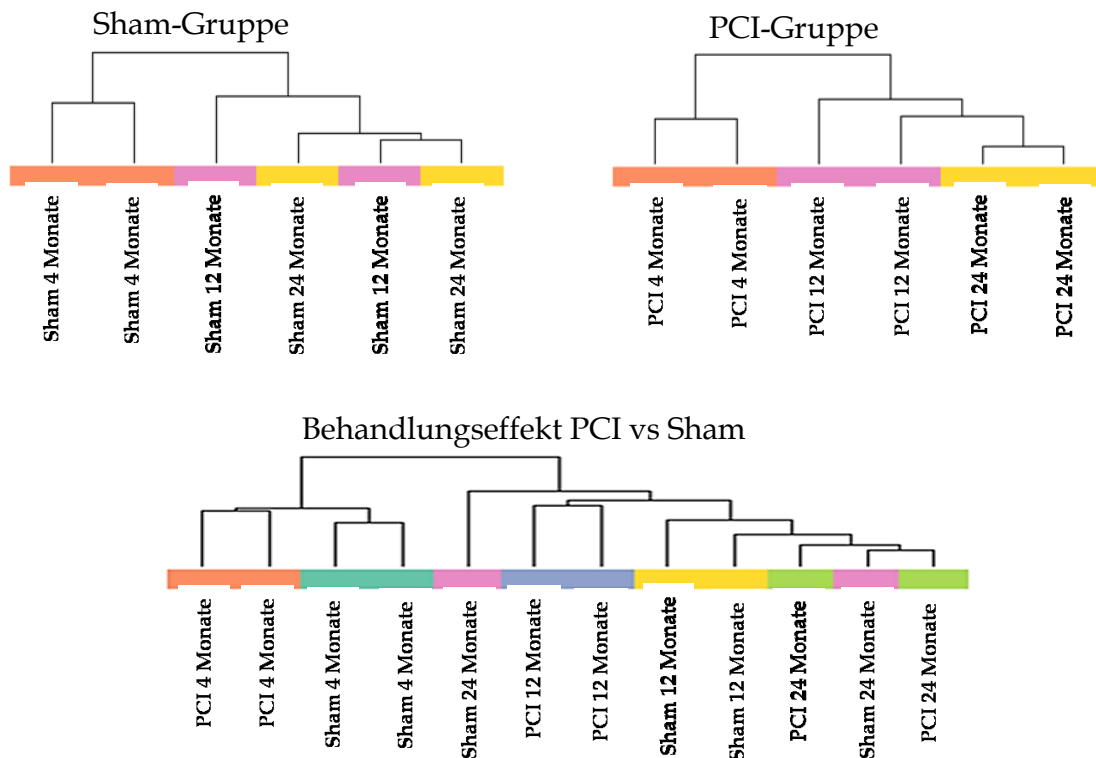


Abb. 21: Dendrogramme der Clusteranalyse der Mikroarray Versuche. In allen Gruppen werden die 4 Monate alten Mäusen von den älteren Mäusen als nicht ähnlich dargestellt. Eine klare Grenzziehung bei den 12- und 24 Monate alten Mäusen gelingt nicht. Die 4 Monate alten Mäuse zeigen einen Behandlungseffekt. Die Sham-Gruppe unterscheidet sich von der PCI-Gruppe. Bei den beiden anderen Gruppen kristallisiert sich kein klarer Behandlungseffekt heraus. Das Alter scheint hier eher für die Ähnlichkeiten im miRNA-Genexpressionsmuster zu sorgen.

Die differenzierte miRNA-Genexpression lässt erkennen, dass miRNAs ein wesentliches regulatorisches Element im menschlichen Immunsystem darstellen. Genetische Veränderungen in der miRNA-Biogenese oder die Fehlregulation individueller miRNAs verhindern die Entwicklung des Immunsystems und führen zur Dysregulation der Wirtsreaktion auf Infektionen (Xiao und Rajewsky 2008). Aufgrund ihrer einfachen Struktur und ihrer direkten Zielerkennung, können miRNAs schnell auf veränderte intra- und extrazelluläre Bedingungen reagieren

(Gardner und Vinther 2008). Diese schnelle Reaktion machen sie zu einem wichtigen Element in der Regulation der Wirtsantwort auf eine Sepsis. Chen et al. (2004) konnten erstmals Nachweisen, dass eine miRNA-Überexpression die Lymphopoese supprimiert. Folgende Experimente, in denen Dicer - das Schlüsselenzym der miRNA Biogenese - inaktiviert wurde, zeigen, dass die Lymphozytenentwicklung und -differenzierung gestört war (Cobb et al. 2005, Muljo et al. 2005). Weiterhin führten miRNA Knockout-Experimente mit miR-155 zu einer veränderten Zytokinproduktion und einer alterierten Antigenpräsentation dendritischer Zellen (Rodriguez et al. 2007). MiRNAs waren nach LPS Stimulation in Leukozyten mehrfach überexprimiert und regulierten damit die Reaktion des angeborenen Immunsystems auf eine Sepsis, so unter anderem die miR-155 (Taganov et al. 2006). Die auch in dieser Arbeit untersuchte miR-181 steuert beispielsweise den *TCR signaling pathway*, der wiederum eine Schlüsselstellung bei der Aktivierung immunkompetenter Zellen einnimmt (Li et al. 2007, de Yébenes et al. 2008). Die gleichfalls untersuchte miR-182 reguliert über den Foxo1 Transkriptionsfaktor die klonale Expansion der T-Helfer Zellen (Stittrich et al. 2010). Ein reduziertes miRNA-106a Level blockiert die B-Zell Entwicklung (Ventura et al. 2008). Über die hier exemplarisch angeführten hinaus konnten weitere miRNAs in Leukozyten identifiziert werden, die bei einer Sepsis differenziert exprimiert waren. Urbich et al. (2008) beschrieben in ihrem *Review* besonders die Rolle der miRNAs in der Regulation der Leukozytenaktivierung und der transendothelialen Migration.

Dabei ist die Regulation der Zielgene der miRNA dosisabhängig. Xiao et al. (2007) wiesen in Versuchen mit der miR-150 nach, dass die zelluläre Konzentration der miRNAs die Proteinproduktion ihrer Zielgene diktiert. Die Hochregulierung sepsisrelevanter miRNAs führt zu einer Konzentrationsänderung von Schlüsselproteinen des Immunsystems. Dies geschieht meist auf einem moderaten Level, aber unter Beeinflussung multipler, funktional zusammengehörender Proteine (Xiao und Rajewsky 2008). Interessanterweise wird die antiinflammatorische Wirkung der miRNAs eher durch eine negative *Feedback*-Regulation inflammatorischer Signaltransduktionswege erreicht, als durch die direktes *targeting* inflammatorischer Mediatoren wie Zytokine oder Chemokine (Sonkoly et al. 2008).

Nicht nur die Wirtsreaktion auf eine bakterielle Sepsis wird durch miRNAs reguliert, auch bei viralen Infekten sind sie beteiligt. Da Viren vollkommen von den zellulären Mechanismen ihres Wirts abhängig sind, sind sie in besonderer Weise der Kontrolle durch miRNAs ausgesetzt. Nach einer Infektion reagieren virale und wirtseigene miRNA wechselseitig miteinander (Scaria et al. 2006). Während einerseits virale miRNAs dem Virus assistieren kann, dem Immunsystem des Wirts zu entkommen (Sullivan 2008), fördern andererseits die zelleigenen miRNAs die antivirale Immunabwehr des Wirts (Lecellier et al. 2005).

Der in dieser Arbeit dokumentierte Unterschied im miRNA-Genexpressionsmuster von jungen und alten Mäusen in zirkulierenden Leukozyten konnte auch in anderen Zellen und Organen nachgewiesen werden (Li et al. 2009 (2), Maes et al. 2008 (1), Bates et al. 2010). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit und die Erkenntnisse in der Literatur, dass miRNAs einen generellen Mechanismus in der Regulation der Wirtsreaktion auf eine Sepsis darstellen, der weit über die regulierende Rolle der durch Kinasen und Transkriptionsfaktoren modulierten Signaltransduktionswege hinaus geht. Ihre schnelle Transkriptionsänderung nach Sepsisinduktion und ihre Fähigkeit, nicht nur einzelne Proteine, sondern den zellulären Status als Ganzes zu kontrollieren und funktionelle Reaktionen in komplexer Art und Weise zu steuern, machen sie zu attraktiven Kandidaten für zukünftige Sepsistherapien.

Validierung durch die qRT-PCR

Zur Validierung der *Mikroarray* Versuche wurde eine qRT-PCR mit zehn selektierten miRNAs durchgeführt. Die ausgewählten miRNAs spielen eine aktive Rolle in der Regulation der sepsis-relevanten *Pathways*. Von daher wurde eine Hochregulierung der entsprechenden miRNAs erwartet. Die Analyse aller zehn selektierten miRNAs im *Dot-Density-Plot* (Abschnitt 5.3.1) ergibt das schon mehrfach beschriebene Muster. Zwischen der PCI- und der Sham-Gruppe der 4 Monate alten Mäuse besteht ein signifikanter Unterschied im Expressionsniveau der miRNAs. Der Mittelwert der PCI-Gruppe liegt bei einem \log_2FC von 1, der der Sham-Gruppe hingegen bei „0“. Auch die adulten Mäuse lassen einen signifikanten Genexpressionsunterschied zwischen beiden Gruppen erkennen. Allerdings bewegen sich beide Mittelwerte

zwischen ± 1 (0,4 und -0,5) und damit unterhalb des Grenzwertes. Die Mäuse reagieren zwar noch auf eine Sepsisinduktion, jedoch scheint die miRNA-Genexpressionsänderung für eine effektive Wirtsreaktion möglicherweise nicht ausreichend zu sein. In der Gruppe der senilen Mäuse gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der PCI- und der Sham-Gruppe. Beide Mittelwerte liegen bei einem \log_2FC von ≈ 0 (-0,4 und -0,2). Eine Wirtsreaktion auf der Ebene der miRNAs scheint nicht vorhanden zu sein.

Nach Sepsisinduktion waren in der Gruppe der gerade geschlechtsreifen Mäuse vier der selektierten miRNAs relevant hochreguliert ($\log_2FC > 1$). Diese sind miR-181d, miR-182, miR-106a und miR-148. Wie aus der Tabelle 16 ersichtlich, belegten sie in mehreren der zehn selektierten *Pathways* vordere Plätze. Die ersten drei der genannten miRNAs wurden bereits als Regulatoren des Immunsystems angesprochen. Besonders die miR-181 Familie ist Gegenstand einer ganzen Reihe von Studien. Die miR-181-Familie wirkt entscheidend mit in der Differenzierung und Funktion der Lymphozyten. Sie steigert die B-Lymphopoese und ist in der T-Zell-Reifung involviert (Chen et al. 2004, Liu et al. 2008, Li et al. 2007). MiR-181b reguliert die Immunantwort auf pro-inflammatorische Stimuli und supprimiert die Transkription von NF- κ B abhängiger mRNA und ihrer Produkte wie Chemokine, Zytokine und anderer wichtiger inflammatorischer Mediatoren. Im Mausmodell inhibiert die systemische Gabe von miR-181b den NF- κ B *Pathway* und reduziert die Mortalität nach Endotoxinschock (Sun et al. 2012). miR-181b inhibiert außerdem Adhäsions- und Gefäßwand-regulierende Moleküle. Damit beeinflusst sie die Durchlässigkeit der Gefäßwand sowie die Extravasation der Leukozyten. Beides sind essentielle Vorgänge der Wirtsreaktion auf die Sepsis (Ley et al. 2007). Das Plasmalevel von miR-181b ist bei septischen ITS-Patienten im Vergleich zu nicht-septischen ITS-Patienten reduziert. Somit fehlt der inhibierende Effekt auf die Adhäsionsmoleküle und anderer Gefäßwand regulierender Moleküle. Es kommt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Gefäßwand und einem Austritt der Leukozyten aus der Blutbahn (Sun et al. 2012).

Neben der oben erwähnten Rolle in der B-Zell Entwicklung wiesen Hackl et al. (2010) nach, dass die miR-106a auch in der zelluläre Seneszenz involviert ist. Die zelluläre

Seneszenz wird charakterisiert durch das Ausscheiden der Zellen aus dem Mitosezyklus. Sie bleiben metabolisch aber weiterhin aktiv und bilden die Grundlage chronischer Infektionen (Schroen und Heymans 2012). Auch die miR-34a ist in die zelluläre Seneszenz involviert. Die Hochregulation von miR-34a korreliert mit einer p53 Aktivierung und einem frühzeitigen Zellzyklusarrest (Fujita et al. 2009). Parallel dazu postulierten Christoffersen et al. (2010), dass die Hochregulation spezifischer miRNA, beispielsweise der miR-34a, den Alterungsprozess in humanen Zellen in Gang setzt. P53 induziert den Zellzyklusarrest über die Transkriptionssteigerung der p21-mRNA. Die miR-106a bindet an die 3'-UTR der p21-mRNA und suprimiert sie (Hackl et al. 2010). Das Protein p21 verhindert durch die Inhibition nachgeschalteter Signalwege die Weiterführung des Zellzyklus. In gealterten Zellen ist die miR-106a reduziert. Damit fehlt die Inhibition der p21-mRNA Translation. Der Zellzyklusarrest kann nicht mehr verhindert werden (Fontana et al. 2008, Brosh et al. 2008).

Die miR-148a wurde im Zusammenhang mit dendritischen Zellen genannt. Sie ist ein negativer Regulator der Reaktion dendritischer Zellen auf eine Infektion und ihrer Antigen-Präsentationskapazität. Zusätzlich supprimieren sie die Genexpression von Zytokinen wie IL-12, IL-6 und TNF- α (Liu et al. 2010).

Von den restlichen sechs selektierten miRNAs in der qRT-PCR wurden die miR-9 und miR-330 in den gerade geschlechtsreifen Mäusen nach Sepsisinduktion zweifach differenziert exprimiert, ohne dabei den Grenzwert von $\log_2FC > 1$ klar zu überschreiten. MiR-9 ist in Monozyten und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten nach LPS Induktion signifikant hochreguliert und kontrolliert über eine negative *Feedback*-Schleife den inflammatorischen Transkriptionsregulator NF- κ B (Bazzoni et al. 2009). In der miRNA-Datenbank wird besonders ihre Rolle im *Focal adhesion Pathway* und dem MAP-Kinase *Pathway* hervorgehoben. Im Zusammenhang mit der Immunregulation fand die miR-330 in der Literatur bisher keine Erwähnung. Um für beide miRNAs eine relevante Genexpressionssteigerung nachweisen zu können, sind Versuche mit einer größeren Anzahl an Versuchstieren notwendig.

Die vier miRNAs miR-152, miR-27a, miR-27b und miR-497 weisen hingegen auch in der Gruppe der gerade geschlechtsreifen Mäuse keine relevante Veränderung in ihrem Transkriptionsmuster auf. Obwohl die ersten drei genannten miRNAs besonders in dem für die Leukozytenaktivierung wichtigen *TCR-Pathway* involviert sind, reichte diese Tatsache nicht für eine zweifache Genexpressionsveränderung aus. Im entfernten Zusammenhang mit dem inflammatorischen Geschehen wurde bisher auch nur die miR-27b genannt. Sie fördert die endothelzellgetriebene Angiogenese (Suarez und Sessa 2009). In murinen Alterungsmodellen fanden Noren Hooten et al. (2012) ein reduziertes Genexpressionsniveau der miR-27a vor. Insgesamt gesehen scheinen sich aber speziell für diese vier miRNAs weiterführende Studien zur Wirtsreaktion auf eine Sepsis nicht zu lohnen. Ihre Rolle in der Tumorphathogenese wurde hingegen ausführlich in der Literatur beschrieben. So ist beispielsweise die miR-152 als Tumorsuppressor in endometrialen Tumoren (Tsuruta et al. 2011), die miR-27b als proonkogenischer Faktor in Mammakarzinomen (Jin et al. 2013) und die miR-497 als Tumorsuppressor in kolorektalen Tumoren (Guo et al. 2012) beschrieben. Die miR-27 Inhibition führt unter anderem zur Wachstumshemmung pankreatischer Karzinomzellen (Ma et al. 2010).

MiRNA haben großen Einfluss auf die Wirkstoffwirksamkeit bzw. -Resistenz in vielen Krankheitsstadien (Li et al. 2011, Allen und Weiss 2010). Das Verständnis der genauen Funktion der miRNA kann in Zukunft helfen, neuartige Therapien zu etablieren oder effizientere Möglichkeiten in Diagnostik und Prognose vieler Krankheiten zu entwickeln. Ehe die hier diskutierten oder ähnliche Strategien am Menschen zum Einsatz kommen können, sind zahlreiche weitergehende Studien von Nöten, die die spezifische Funktion einzelner miRNA bei den verschiedenen Krankheiten untersuchen. Darüber hinaus muss die experimentelle Reliabilität der miRNA-Forschung verbessert werden. Die Verfahren des *Next Generation Sequencings* (NGS) liefern dafür einen neuen Ansatz. Bei nur geringem Probeneinsatz (Parkinson et al. 2012) und hoher Sensitivität (Harismendy et al. 2009) gestatten diese kostensparenden Methoden durch parallele Sequenzierung die Herstellung millionenfacher Sequenzen gleichzeitig (Hall 2007, Tucker et al. 2009). Die NGS-Technologie wird mittlerweile unter anderem zur Genom-Sequenzierung (Hiller et al. 2008, Shen et al.

2008), der Mutationssuche, (Qi et al. 2009, Trick et al. 2009), der Biomarkerdetektierung (Holt et al. 2008) und zum Erstellen eines Transkriptionsprofils (Peters et al. 2007, Yassour et al. 2009) genutzt. Den größten *Impact* und die höchste Effektivität hat das NGS wohl auf die Entdeckung und Erforschung der ncRNAs, inklusive der miRNAs (Labaj et al. 2011, Leshkowitz 2013). Immer häufiger wird zur miRNA-Identifikation oder für miRNA-Genexpressionsprofile die NGS-Technologie genutzt (Morin et al. 2008, Wheeler et al. 2009, Chaudhry et al. 2013, Chang et al. 2013). Während *Microarrays* die Sequenz des zu untersuchenden Transkripts im Voraus benötigen, bieten NGSs die Möglichkeit, im Prozess der Auswertung neue Sequenzen zu entdecken (Welch et al. 2011, Link et al. 2011). Einige Studien haben die Fähigkeit von *Microarrays* und NGS-Technologien hinsichtlich der Erfassung einer differenzierten miRNA-Expression verglichen (Fahlgren et al. 2009, Willenbrock et al. 2009, Git et al. 2010). Willenbroeck et al. (2009) fanden dabei, dass bei Verfahren in Bezug auf relative Quantifizierung und Reproduzierbarkeit ebenbürtig sind. Git et al. (2010) sahen dagegen das Agilent *Microarray* Verfahren den NGS überlegen. Dies traf aber nicht für andere *Microarrays* zu. Es bleibt abzuwarten, welches Verfahren sich in Zukunft für die Untersuchung der leukozytären miRNA durchsetzen wird.

Abschließend kann gesagt werden, dass sich das verwendete PCI-Modell zur Induktion einer intraabdominellen Sepsis sehr gut eignet, um murine Sepsisexperimente mit einer hohen Standardisierung und Reproduzierbarkeit durchzuführen. Durch die Verwendung einer polymikrobiellen humanen Stuhlsuspension kommt es dem klinischen Bild einer bakteriellen Peritonitis sehr nahe. Die *Microarray*-Analyse erwies sich als ein zuverlässiges Verfahren zur Beschreibung des miRNA-Transkriptionsprofils in zirkulierenden Leukozyten. Durch die gezielte Analyse einzelner miRNAs in der qRT-PCR konnten die Ergebnisse wiederholt werden und bestätigten damit die *Microarray*-Analyse. Die hier vorgestellte Pilotstudie soll als Beitrag und wertvolle Quelle für weitergehende, zielgerichtete Forschungsarbeiten zur miRNA-Regulation der Sepsis dienen. Die dokumentierten Änderungen des miRNA-Genexpressionsprofils im Alter (physiologisch und nach Sepsisinduktion) dürfen nicht nur experimentelle

Konsequenzen haben. Sie müssen auch bei der Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Verfahren für die Sepsis berücksichtigt werden.

7 Schlussfolgerungen

Mit der in den letzten Jahren eingeführten Hochdurchsatz-Sequenzierung sowie den Transkriptionsmessungen hat sich das Wissen über die Regulation bei der Stressreaktion in humanen Zellen beträchtlich erweitert. Die Entdeckung, dass miRNAs regulative Elemente mit weit reichendem Einfluss sind, hat sie in ins Zentrum der Erforschung von diagnostischen Möglichkeiten, von pathogenetischen Prozessen und therapeutischen Konzepten vieler Krankheiten aufsteigen lassen.

Bis heute existiert kein erfolgreiches kausatives oder adjunktives Behandlungsverfahren zur Therapie der Sepsis. Sämtliche, in tierexperimentellen Untersuchungen erfolgversprechende spezifische Wirkstoffstudien scheiterten am fehlenden Wirksamkeitsnachweis am Patienten. Eine wesentliche Ursache für das Scheitern therapeutischer Sepsisstudien ist möglicherweise die ineffiziente Stratifizierung der Studienpatienten. Darüber hinaus könnte die Missachtung der Alterskorrelation der Wirtsreaktion auf die Sepsis eine Rolle spielen. Vielfach werden tierexperimentelle Sepsisstudien an jungen Versuchstieren vorgenommen. Dies entspricht aber nicht der reellen Situation überwiegend älterer Sepsispatienten auf der ITS.

Das hier eingesetzte murine Alterungsmodell beweist die veränderte Wirtsreaktion auf die Sepsis auf der Ebene der miRNA-Genexpression. Das PCI-Modell der intraabdominellen Sepsisinduktion kommt dem klinischen Befund einer polymikrobiellen Peritonitis sehr nahe. Zur Genexpressionsanalyse wurden mit der *Microarray* Analyse und der qRT-PCR zwei unabhängige und komplementäre Verfahren eingesetzt. Diese Vorgehensweise eignete sich gut, um die aufgestellten Hypothesen zu bestätigen

Die Auswertung der so gewonnenen Daten macht deutlich, dass sich auch ohne Intervention das miRNA-Genexpressionsniveau in zirkulierenden Leukozyten seniler Mäuse signifikant von dem junger Mäuse unterscheidet. Nach Induktion einer Sepsis besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen der differenzierten miRNA-Genexpression seniler und gerade geschlechtsreifer Mäuse.

Dabei fällt im Alter die miRNA-Genexpressionsänderung signifikant schwächer aus als bei jungen Tieren. MiRNAs wirken in erster Linie über negative *Feedback*-Schleifen einer überschießenden Wirtsreaktion entgegen und tragen dazu bei die inflammatorische Homöostase wieder herzustellen. Die verminderte miRNA-Genexpressionsänderung im Alter ist eine Ursache für die Dysregulation der Wirtsreaktion auf eine Sepsis im Alter.

Der Phänotyp der zirkulierenden Leukozyten stellt sowohl von der diagnostischen als auch der therapeutischen Perspektive aus ein hochinteressantes *Target* dar. Die selektierten miRNAs sind an der Regulation wichtiger Signaltransduktionswege für die Wirtsreaktion auf eine Sepsis beteiligt. Bei senilen Mäusen kommt es nach Sepsisinduktion zu keiner differenzierten Genexpression dieser miRNAs. Sie können ihre Funktion bei der Kontrolle der Signaltransduktionswege nicht in vollem Maße ausüben.

In Zukunft sollte deshalb zum Studium sowohl der pathophysiologischen Grundlagen als auch zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien für die Sepsis auf murine Alterungsmodelle zurückgegriffen werden. Erst wenn die altersspezifischen Veränderungen der Wirtsreaktion auf eine Sepsis mit berücksichtigt werden, können neue Wirkstoffstudien Erfolg haben.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wäre als nächster Schritt eine Pilotstudie an septischen Patienten zu bedenken. In zirkulierenden Leukozyten sollte bei unterschiedlichen Altersgruppen überprüft werden, ob die gefundenen altersabhängigen murinen miRNA-Genexpressionsänderungen auch am Menschen zu beobachten sind. Nicht zuletzt kann in Zukunft das miRNA-Genexpressionsmuster helfen die Studienheterogenität zu minimieren. Für eine angepasste und effektivere Therapie könnten in zukünftigen Wirkstoffstudien durch differenziert exprimierte miRNAs geeignete Subpopulationen definiert werden und zum Erfolg dieser Studien beitragen.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Acha SJ, Kuhn I, Mbazima G, et al. 2005. Changes of viability and composition of the *Escherichia coli* flora in faecal samples during long time storage. *J Microbiol Methods*. 63:229.
- Ademokun A, Wu YC, Dunn-Walters D. 2010. The ageing B cell population: composition and function. *Biogerontology*. 11:125–137.
- Adler SN, Gasbarra DB. 2005. *A Pocket Manual of Differential Diagnosis*. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins
- Ahmad S, Choudhry MA, Shankar R, Sayeed MM. 1997. Transforming growth factor-beta negatively modulates T-cell responses in sepsis. *FEBS Lett*. 402(2-3):213-8.
- Allen KE, Weiss GJ. 2010. Resistance may not be futile: microRNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics. *Mol Cancer Ther*. 9:3126.
- Anderson RN. 1999. Some trends and comparisons of United States life table data 1900–1991. In *U.S. Decennial Life Tables for 1989–1991*. Vol. 1(3). Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics, p 5.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets, *Cancer Res*. 64 5245-5250.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J and Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29: 1303-1310
- Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 122(4):553-63.
- Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. 2008. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol*, 9:839-845.
- Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. 2008. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer*, 122:969-977.
- Barndorff-Nielsen OE, Sobel M. 1966. On the distribution of the number of admissible points in a vector random sample, *Teor. Veroyatnost. i Primenen*. 11:2, 283–305

- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2), 281-97.
- Bartel DP. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233.
- Bartlett JG, Onderdonk AB, Louie T, Kasper DL, Gorbach SL. 1978. Lessons learned from an animal model of intra-abdominal sepsis. *Arch Surg* 113:853-857.
- Bates DJ, Liang R, Li N, Wang E. 2009. The impact of noncoding RNA on the biochemical and molecular mechanisms of aging. *Biochim Biophys Acta*. 1790(10):970-9.
- Bates DJ, Li N, Liang R, Sarojini H, An J, et al. 2010. MiRNA regulation in Ames dwarf mouse liver may contribute to delayed aging. *Aging Cell*. 9, 1-18.
- Bazzonia F, Rossatoa M, Fabbrib M, Cassatellaa MA, Locatib M, et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Izaurralde E. 2006 (1). MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 71:523-30.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. 2006 (2). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*. 20(14):1885-98.
- Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Lithgow GJ, Campisi J, et al. 2009. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescenceassociated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany NY)* 1, 402.
- Biswas SK, Lopez-Collazo E. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 30:475.
- Boehm M, Slack F. 2005. A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science*. 310, 1954-1957.
- Bone RC. 1989. *The Rush Internal Medicine Handbook*. ISBN-10: 0815110367
- Bopp T, Becker C, Klein M, Jonuleit H, Schmitt E, et al. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*. 204:1303-1310.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 13(12):1097-101.

- Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Vilo J, Vingron M, et al. 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*, 29 (4):365-371.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 3(3):e85.
- Brosh R, Shalgi R, Liran A, Landan G, Korotayev K, et al. 2008. p53-Repressed miRNAs are involved with E2F in a feed-forward loop promoting proliferation. *Mol Syst Biol* 4: 229.
- Brun-Buisson C. 2000. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med*. 26(S1), 64-74
- Bushati N, Cohen SM. 2007. microRNA Functions *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23:175-205.
- Calandra T, Cohen J. 2005. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 33(7):1538-48.
- Candore G, Vasto S, Colonna-Romano G, Lio D, Caruso M, Rea IM, Caruso C. 2006. Cytokine gene polymorphisms and atherosclerosis. In: Koen, V. (Ed.), *Cytokine Gene Polymorphisms in Multifactorial Conditions*. CRC Press, Florida, USA, pp. 363-378.
- Carlet J, Cohen J, Calandra T, Opal SM, Masur H. 2008. Sepsis: time to reconsider the concept. *Crit Care Med*. 36(3):964-6.
- Caruso C, Candore G, Colonna-Romano G, Lio D, Franceschi C. 2005. Inflammation and life-span. *Science* 307, 208-209.
- Chang ST, Thomas MJ, Sova P, Green RR, Palermo RE, Katze MG. 2013. Next-Generation Sequencing of Small RNAs from HIV-Infected Cells Identifies Phased microRNA Expression Patterns and Candidate Novel microRNAs Differentially Expressed upon Infection. *MBio*. 4(1). pii: e00549-12.
- Chaudhry MA, Omaruddin RA, Brumbaugh CD, Tariq MA, Pourmand N. 2013. Identification of radiation-induced microRNA transcriptome by next-generation massively parallel sequencing. *J Radiat Res*. [Epub ahead of print]
- Chekulaeva M, Hentze MW, Ephrussi A. 2006. Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell* .124(3):521-33
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 303:83-86.

- Chen JJ, Tsai CA, Tzeng S, Chen CH. 2007. Gene selection with multiple ordering criteria. *BMC Bioinformatics*. 8:74.
- Chen JF, Callis TE, Wang DZ. 2009. microRNAs and muscle disorders. *J Cell Sci* 122:13-20
- Chen X, Ba Y, Ma L, et al. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 18:997-1006
- Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. 2012. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* 3, 28-37.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 18(24):5294-9.
- Chomczynski P und Sacchi N. 1986. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem*. 162(1):156-9.
- Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Oren M, Lund AH, et al. 2010. p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ*. 17, 236-245.
- Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Smale ST, Merkenschlager M, et al. 2005. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J. Exp. Med*. 201, 1367-1373.
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885-891
- Cohen J, Opal S, Calandra T. 2011. Sepsis studies need new direction. *Lancet Infect Dis*. 12(7):503-5.
- Cross AS, Opal SM, Sadoff JC, et al. 1993. Choice of bacteria in animal models of sepsis. *Infect Immun*. 61:2741.
- D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Spazzafumo L, De Simone M, et al. 2010. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 31:2765Y2773.
- Daley BJ. 2011. Peritonitis and Abdominal Sepsis. medscape.com/article/180234
- Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P and Lamy M. 1992. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg*, 215: 356-362

- Dan M, Richardson J, Miliotis MD, et al. 1989. Comparison of preservation media and freezing conditions for storage of specimens of faeces. *J Med Microbiol.* 28:151.
- de Yébenes VG, Belver L, Pisano DG, He L, Ramiro AR, et al. 2008. miR-181b negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells. *J. Exp. Med.* 205, 2199–2206.
- Deitch EA. 2005. Rodent Models of intra-abdominal Infection. *Shock.* 24 Suppl 1:19-23.
- Dellinger RP, Tomayko JF, Angus DC, et al. 2009. Efficacy and safety of a phospholipid emulsion (GR270773) in Gram-negative severe sepsis: results of a phase II multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-finding clinical trial *Crit Care Med*, 37, pp. 2929–2938
- Denisov V, Strong W, Walder M, Gingrich J, Rubio T, Rémy A. 2008. RNA quality Indicator (RQI) – A New Tool for Assessing RNA Integrity to reliably detect differences in gene expression using qPCR experiments. *Bio-Rad Lab Bulletin* 5671 Rev B
- Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V., <http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Krankheitsbild+Sepsis/>
- Divakaran V, Mann D. 2008. The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res.* 103:1072.
- Doench JG, Sharp PA. 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18(5):504-11.
- Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J and Paz HL. 2007. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med*, 35: 1244-1250
- Du T, Zamore PD. 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development.* 132(21):4645-52.
- Dyson A, Singer M. 2009. Animal models of sepsis: Why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med.* 37:S30.
- Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Danner RL, Natanson C, et al. 2002. Risk and the efficacy of anti-inflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care.* 166(9):1197-205.
- Engel C, Brunkhorst FM, Löffler M, Reinhart K. 2007. Diagnose und Epidemiologie der Sepsis. *Ärzteblatt Thüringen.* Ausgabe 7. S. 414-417

- Ester M, Sander J. 2000. Knowledge Discovery in Databases: Techniken und Anwendungen. Springer, Berlin, ISBN 3540673288
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. 2007. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol.* 27(11):3970-81.
- Eykyn SJ, Gransden WR, Phillips I. 1990. The causative organisms of septicaemia and their epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 25 Suppl C:41-58.
- Fahlgren N, Sullivan CM, Kasschau KD, Backman TW, Givan SA, et al. 2009. Computational and analytical framework for small RNA profiling by high-throughput sequencing. *RNA* 15: 992-1002.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9(2):102-14.
- Fiore R, Siegel G, Schratt G. 2008. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1779:471-478.
- Fleige S, Pfaffl MW. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 27(2-3):126-39.
- Fleury G, Hero AO, Yoshida S, Carter T, Barlow C, Swaroop A. 2002. Pareto analysis for gene filtering in microarray experiments. European Signal Processing Conference (EUSIPSO), Toulouse, France
- Fontana L, Fiori ME, Albin S, Cifaldi L, Giovinnazzi S et al. 2008. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One* 3, e2236.
- Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP. 1998. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol.* 9(1):67-78.
- Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. 1995. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today.* 16(1):12-6.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. 2000. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 908:244-54.
- Frasca D, Landin AM, Riley RL, Blomberg BB. 2008. Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans. *J Immunol.* 180:2741-2746.

- Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K et al. 2009. p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat. Cell. Biol.* 11, 1135–1142.
- Gardner PP, Vinther J. 2008. Mutation of miRNA target sequences during human evolution. *Trends Genet.* 24, 262–265.
- Garzon R, Calin GA, Croce CM. 2009. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 60: 167–179.
- Gatfield D, LeMartelot G, Vejnar CE, Zdobnov EM, Schibler U et al. 2009. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev.* 23, 1313–1326.
- Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA. 2007. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 67(6):2456–68.
- Geerdes HF, Ziegler D, Lode H, Hund M, Loehr A, Fangmann W, Wagner J. 1992. Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979 and 1989. *Clin Infect Dis.* 15(6):991–1002.
- Geiger H, Rudolph KL. 2009. Aging in the lympho-hematopoietic stem cell compartment. *Trends Immunol.* 30:360–265.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM. 2004. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics *Genome Biology.* 5:R80. <http://genomebiology.com/2004/5/10/R80>.
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. 2008. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE.* 3:e3148
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. 2001. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 74, S. 833–839.
- Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P, Caldas C. 2010. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA* 16: 991–1006.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Claus RA, Bauer M, et al. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res.* 170(1):e123–34.
- Goodwin JS. 1995. Decreased immunity and increased morbidity in the elderly. In: *Nutr Rev* 53, S. S41–45. PMID 7644153 (Review)

- Gorospe M, Abdelmohsen K. 2011. MicroRegulators come of age in senescence. *Trends Genet.* 27, 233–241.
- Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H, Vestweber D. 1997. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci.* 110 (Pt 5):583-8.
- Graf J, Doig G S, et al. (2002) Randomized, controlled clinical trials in sepsis: has methodological quality improved over time? *Crit Care Med* 30(2): 461-472.
- Grassmann R, Jeang K-T. 2008. The roles of microRNAs in mammalian virus infection. *Biochim Biophys Acta*, 1779:706-711.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34: D140-144
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright SA. 2008. MiRBase: tools for microRNA genomics, *Nucleic Acids Res* 36 D154–D158.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 27(1):91-105.
- Großhans H, Chatterjee S. 2010. MicroRNases and the regulated degradation of mature animal miRNAs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 700, 140–155.
- Grubeck-Loebenstein B, Wick G. 2002. The aging of the immune system. *Annu Rev Immunol.* 80:248–90.
- Guo ST, Jiang CC, Wang GP, Jin L, Zhang XD, et al. 2012. MicroRNA-497 targets insulin-like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer. *Oncogene*. [Epub ahead of print]
- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1264–1300
- Gustot T. 2011. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr Opin Crit Care.* 17(2):153-9.
- Hackl M, Brunner S, Fortschegger K, Jansen-Dürr P, Grillari J, et al. 2010. miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging Cell*, 9:291-296.
- Hall N. 2007. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J. Exp. Biol.* 210 (Pt 9): 1518–25.

- Harismendy O, Ng PC, Strausberg RL, Topol EJ, Levy S. et al. 2009. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biol.* (3):R32.
- Haug JB, Harthug S, Kalager T, Digranes A, Solberg CO. 1994. Bloodstream infections at a Norwegian university hospital, 1974-1979 and 1988-1989: changing etiology, clinical features, and outcome. *Clin Infect Dis.* 19(2):246-56.
- Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Ferrell JE, Brown PO, et al. 2009. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol* 7, e1000238.
- Henke JL, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C, Niepmann M. 2008. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27, 3300-3310.
- Hillier LW, Marth GT, Quinlan AR, Dooling D, Hickenbotham M, Huang W. et al. 2008. Whole-genome sequencing and variant discovery in *C. elegans*. *Nat Methods.* (2):183-188.
- Holloway J, Laar van RK, Tothill RW, Bowtell DD. 2002. Options available--from start to finish--for obtaining data from DNA microarrays II, *Nat. Genet.* 32 Suppl, 481-489
- Holt KE, Parkhill J, Mazzoni CJ, Maskell DJ, Wain J. et al. 2008. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella Typhi*. *Nat Genet.* 40(8):987-993.
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27(7):1230-51.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 348(2):138-50.
- Hsieh CH, Rau CS, Jeng JC, Tzeng SL, Yang JCS et al. 2012. Whole blood-derived microRNA signatures in mice exposed to lipopolysaccharides. *J Biomed Sci.* 19:69.
- Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. 2005. Cecal ligation and puncture. *Shock.* 24(Supp I):52.
- Huber W, Heydebreck von A, Sueltmann H, Poustka A, Vingron M. 2002. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to quantification of differential expression. *Bioinformatics.* 18:S96. S.104

- Hyde SR, Stith RD, McCallum RE. 1990. Mortality and bacteriology of sepsis following cecal ligation and puncture in aged mice. *Infect. Immun.* 58:619-624.
- Ibanez-Ventoso C, Yang M, Guo S, Robins H, Padgett RW, Driscoll M. 2006. Modulated microRNA expression during adult lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5, 235–246.
- Jara PI, Boric MP, Sáez JC. 1995. Leukocytes express connexin 43 after activation with lipopolysaccharide and appear to form gap junctions with endothelial cells after ischemia-reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(15):7011-5.
- Jiang M, Xiang Y, Wang D, Gao J, Liu D, Liu Y, Liu S, Zheng D. 2012. Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages. *Aging Cell* 11, pp29–40
- Jin L, Wessely O, Marcusson E, Ivan C, Calin G, Alahari SK. 2013. Pro-oncogenic factors miR-23b- and miR-27b are regulated by Her2/Neu, EGF, and TNF α in breast cancer. *Cancer Res.* [Epub ahead of print]
- Kale SS, Yende S, Kong L, Vallejo AN, Angus DC, et al. 2011. The effects of age on inflammatory and coagulation-fibrinolysis response in patients hospitalized for pneumonia. *PLoS One*, 5: e13852
- Kale SS, Yende S. 2011. Effects of Aging on Inflammation and Hemostasis through the Continuum of Critical Illness. *Aging Dis.* 2(6):501-11.
- Karnitz LM, Abraham RT. 1995. Cytokine receptor signaling mechanisms. *Current Opinion in Immunology.* 7:320-326
- Kawasaki ES und Wang AM. 1989. Detection of Gene Expression. Erlich, H.A. ed. *PCR Technology: Principles and Applications of DNA Amplification*, Stockton Press, Inc., NY, pp. 89–97.
- Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, Hatzigeorgiou A. 2004. A combined computational experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev.* 18, 1165–1178.
- Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. 2007. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell.* 129(6):1141-51.
- Kong XY, Du YQ, Li L, Xiao LN, Zheng YZ, et al. 2010. Plasma miR-216a as a potential marker of pancreatic injury in a rat model of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 16:4599Y4604.
- Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. 2004. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol.* 39(5):687-99.

- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. 2007. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet.* 39(5):673-7.
- Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. 2006. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem.* 99:671Y678.
- Labaj PP, Leparc GG, Linggi BE, Markillie LM, Wiley HS, Kreil DP. 2011. Characterization and improvement of RNA-Seq precision in quantitative transcript expression profiling. *Bioinformatics* 27 (13): i383-i391.
- Landry DW, Oliver JA. 2001. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med.* 345:588-595
- Le TY, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. 2002. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 18(6):487-94.
- Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saib A, Voinnet O. 2005. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308, 557-560.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75(5):843-54.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23(20):4051-60.
- Leonard WJ. 1999. Type I cytokines and interferons and their receptors. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. p 741-4.
- Leonard WJ, Lin JX. 2000. Cytokine receptor signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 105(5):877-88.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Angus D, Cook D, et al. 2003. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference, *Crit. Care Med.* 1250-1256.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.

- Lewis B, Burge C, Bartel D. 2005. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*, 120:15-20.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74:49-139
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky ML, Nourshargh S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 7(9):678-689.
- Li G, Luna C, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. 2009 (1). Alterations in microRNA expression in stress-induced cellular senescence. *Mech Ageing Dev*, 130:731-741.
- Li N, Bates DJ, An J, Terry DA, Wang E. 2009 (2). Up-regulation of key microRNAs, and inverse down-regulation of their predicted oxidative phosphorylation target genes, during aging in mouse brain. *Neurobiol Aging*. 32(5):944-55
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 24:99-146.
- Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Davis MM, Chen CZ et al. 2007. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*. 129:147-61.
- Li X, Pan YZ, Seigel GM, et al. 2011. Breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 regulatory microRNAs (hsa-miR-328, -519c and -520h) and their differential expression in stem-like ABCG2⁺ cancer cells. *Biochem Pharmacol* 81:783.
- Liang R, Bates DJ, Wang E. 2009. Epigenetic Control of MicroRNA Expression and Aging. *Curr Genomics* 10: 184-193.
- Licastro F, Candore G, Lio D, Porcellini E, Colonna-Romano G, Franceschi C, Caruso C. 2005. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun. Ageing* 2, 8.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Linsley PS, Johnson, et al. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *JM. Nature*. 433(7027):769-73.
- Lin ZY, Xu PB, Yan SK, Meng HB, Yang GJ, Dai WX, et al. 2009. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis by (1)H NMR and pattern recognition, *NMR Biomed*. 22 601-608.
- Link DC, Schuettpelz LG, Shen D et al. 2011. Identification of a novel TP53 cancer susceptibility mutation through whole-genome sequencing of a patient with therapy-related AML. *JAMA*, 305 (15): 1568-1576.

- Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bassel-Duby R, Olson EN, et al. 2007. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:20844–20849.
- Liu G, Min H, Yue S, Chen CZ. 2008. Pre-miRNA loop nucleotides control the distinct activities of mir-181a-1 and mir-181c in early T cell development. *PLoS One.* 3:e3592
- Liu X, Zhan Z, Xu L, Ma F, Li D, Guo Z, Li N, Cao X. 2010. MicroRNA-148/152 impair innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMKII α . *J Immunol.* 185(12):7244-51.
- Lloyd SP. 1957. Least square quantization in PCM. Bell Telephone Laboratories Paper. 1982 in *IEEE Transactions on Information Theory.* 28, 1982, S. 129-137
- Lopez A, Lorente JA, Steingrub J et al. 2004. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 32, pp. 21–30
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, SweetCordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, et al. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435:834-838.
- Luke A. J. O'Neill: Das immunologische Frühwarnsystem. *Spektrum der Wissenschaft* August 2005, Seiten 68–75
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. 2007. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(23):9667-72.
- Ma Y, Yu S, Zhao W, Lu Z, Chen J. 2010. miR-27a regulates the growth, colony formation and migration of pancreatic cancer cells by targeting Sprouty2. *Cancer Lett.* 298(2):150-8.
- Maes OC, An J, Sarojini H, Wang E. 2008 (1). Murine miRNAs implicated in liver functions and aging process. *Mech. Ageing Dev.* 129, 534–541.
- Maes OC, Sarojini H, Wu H, Wang E. 2008 (2). Changes in MicroRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation. *J Cell Biochem*, 105:824-834.
- Marshall JC. 2004. Intra-abdominal infections. *Microbes Infect.* 6(11):1015-25.
- Martin GS, Mannino DM and Moss M. 2006. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*, 34: 15-21

- Michiels S, Koscielny S, Hill C. 2005. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet*. 5-11.365(9458):488-92.
- miRBase 19. 2012. <http://www.mirbase.org/blog/2012/08/mirbase-19-released/>
- Moore CC, McKillop IH, Huynh T. 2012. MicroRNA expression following activated protein C treatment during septic shock. *J Surg Res*. [Epub ahead of print]
- Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Zeng T, Hirst M. et al. 2008. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res*. 18(4):610-621.
- Mudhasani R, Zhu Z, Hutvagner G, Imbalzano AN, Jones SN, et al. 2008. Loss of miRNA biogenesis induces p19Arf-p53 signaling and senescence in primary cells. *J. Cell Biol*. 181, 1055-1063.
- Muljo SA, Ansel KM, Kanellopoulou C, Livingston DM, Rao A, Rajewsky K. 2005. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J. Exp. Med*. 202, 261-269.
- Muller WA. 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in Immunol*. 24:326-333.
- Muller WA. 2007. PECAM: regulating the start of diapedesis. In: Ley K, ed. *Adhesion Molecules: Function and Inhibition*. Basel: Birkhauser Verlag AG: 201-220.
- Muller WA. 2009. Mechanisms of Transendothelial Migration of Leukocytes *Circulation Research*. 105: 223-230.
- Mural RJ, Stephenson LD, et al. 2002. A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science*. 296(5573):1661-71.
- Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. 2005. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature*. 434:83-88.
- Niepmann M. 2009. Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA. *Cell Cycle*. 8:1473Y1477.
- Noren Hooten N, Abdelmohsen K, Gorospe M, Ejiogu N, Zonderman AB, Evans MK. 2010. microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS One*. 5(5):e10724.
- Ohyashiki M, Ohyashiki JH, Hirota A, Kobayashi C, Ohyashiki K. 2011. Age-related decrease of miRNA-92a levels in human CD8⁺ T-cells correlates with a reduction of naïve T lymphocytes. *Immun Ageing*. 8(1):11.

- Oviedo-Orta E, Gasque P, Evans WH. 2001. Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. *Faseb J.* 15:768-774.
- Pant S, Hilton H, Burczynski ME. 2012. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1484-1494.
- Parker R, Sheth U. 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell.* 25(5):635-46.
- Parker R, Song H. 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11, 121-127.
- Parkinson NJ, Maslau S, Ferneyhough B et al. 2012. Preparation of high quality next generation sequencing libraries from picogram quantities of target DNA. *Genome Res* 22 (1): 125-133.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Davidson E, Ruvkun G, et al. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 408(6808):86-9.
- Pauley KM, Satoh M, Chan AL, et al. 2008. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10:R101
- Pavlidis TE. 2003. Cellular changes in association with defense mechanisms in intra-abdominal sepsis. *Minerva Chir.* 58(6):777-81.
- Pearson G, Robinson F, Karandikar M, Berman K, Cobb MH et al. 2001. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews* 22(2): 153-183
- Pedotti P, Hoen P, Vreugdenhil E, Boer J, Menezes R, et al. 2008. Can subtle changes in gene expression be consistently detected with different microarray platforms? *BMC Genomics*, 9: 124
- Peters L, Meister G. 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell.* 26(5):611-23.
- Peters LM, Belyantseva IA, Lagziel A, Battey JF, Friedman TB, Morell RJ. 2007. Signatures from tissue-specific MPSS libraries identify transcripts preferentially expressed in the mouse inner ear. *Genomics.* 89(2):197-206.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.

- Pinheiro-da-Silva F, Chiamolera M, Charles N, Velasco IT, Benhamou M, et al. 2006. B lymphocytes undergo apoptosis because of FcγRIIb stress response to infection: a novel mechanism of cell death in sepsis. *Shock* 25(1):61-5.
- Pittet D, Wenzel RP. 1995. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. *Arch Intern Med.* 155(11):1177-84.
- Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. 2008. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock.* 30 Suppl 1:53-9.
- Poliseno L, Pitto L, Simili M, Pandolfi PP, Rainaldi G, et al. 2008. The proto-oncogene LRF is under post-transcriptional control of MiR-20a: implications for senescence. *PLoS One* 3, e2542.
- Pugin J. 2002. Biomarkers of sepsis: is procalcitonin ready for prime time?, *Intensive Care Med.* 28 1203–1204.
- Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Tobias PS, Ulevitch RJ, et al. 1994. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* 1 509-516
- Qi W, Kaser M, Roltgen K, Yeboah-Manu D, Pluschke G. 2009. Genomic diversity and evolution of *Mycobacterium ulcerans* revealed by next-generation sequencing. *PLoS Pathog.* 5(9):e1000580.
- QIAGEN miScript PCR System Handbook. 2009. Second Edition. QIAGEN Sample and Assay Technologies. www.qiagen.com.
- R Development Core Team. 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Rana TM. 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1):23-36.
- Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Trollinger D, Tryon V, et al. 2002. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem.* 48(11):1883-90.
- Rea IM, Candore G, Cavallone L, Caruso C et al. 2006. In: Koen, V. (Ed.), *Cytokine Gene Polymorphisms in Multifactorial Conditions*. CRC Press, Florida, USA, pp. 379–394.
- Recknagel P, Gonnert FA, Halilbasic E, Claus RA, Kortgen A, Trauner M, Singer M, Bauer M, et al. 2012. Mechanisms and functional consequences of liver failure substantially differ between endotoxaemia and faecal peritonitis in rats. *Liver Int.* 33(2):283-93.

- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 24.403(6772):901-6.
- Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J and Nemzek JA. 2002. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock*, 17: 463-467
- Remick DG, Newcomb DE, Bologos GL, Call DR. 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide versus cecal ligation and puncture. *Shock* 13:110-116.
- Richter JD, Sonenberg N. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*. 433(7025):477-80.
- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*. 4:31.
- Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Das PP, Miska EA, et al. 2007. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316, 608-611.
- Saito H, Sherwood ER, Varma TK and Evers BM. 2003. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev*, 124: 1047-1058
- Saito H, Sherwood ER, Varma TK, Evers BM. 2012. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis *Aging Cell* 11, pp29-40
- Sakaguchi S, Benham H, Cope AP, Thomas R. 2012. T-cell receptor signaling and the pathogenesis of autoimmune arthritis: insights from mouse and man. *Imm and Cell Bio* 90: 277-287.
- Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Pillai B, Brahmachari SK. 2006. Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology* 3, 68.
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Kwong DLW, Au GKH, et al. 2008. MicroRNA Expression Profiles Associated With Prognosis and Therapeutic Outcome in Colon Adenocarcinoma. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 299:425-436.
- Schmidt WM, Spiel AO, Jilma B, Wolzt M, Müller M. 2009. In vivo profile of the human leukocyte microRNA response to endotoxemia. *Biochem. Biophys. Res Com*. 380 437-441

- Schröder S, Lindemann C, Decker D, Klaschik S, Hering R, Putensen C, et al. Increased susceptibility to apoptosis in circulating lymphocytes of critically ill patients. *Langenbecks Arch Surg* 386(1):42-6.
- Schroen B, Heymans S. 2011. Small but smart - microRNAs in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing. *Cardiovasc Res.* 93(4):605-13.
- Seier E. 2002 Comparison of Tests for Univariate Normality <http://interstat.statjournals.net/YEAR/2002/articles/0201001.pdf>
- Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58-63.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. 2004. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 5(3):R13.
- Sen TZ, Andorf CM, Schaeffer ML, Campbell DA, Lawrence CJ, et al. 2009. MaizeGDB becomes 'sequence-centric'. Database.
- Shapiro S, Wilk MB. 1965. An analysis of variance test for normality. *Biometrika* 52, 591-611
- Sheedy FJ, O'Neill LA. 2008. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis* 67(Suppl 3):iii50-5
- Shen Y, Sarin S, Liu Y, Hobert O, Pe'er I. 2008. Comparing platforms for *C. elegans* mutant identification using high-throughput whole-genome sequencing. *PLoS One.* 3(12):e4012.
- Shields AM, Panayi GS, Corrigan VM. 2011. Resolution-associated molecular patterns (RAMP): RAMPs defending immunological homeostasis? *Clin Exp Immunol.* 165 (3):292-300.
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell.* 5(4):659-69.
- Sogaard M, Schonheyder HC, Riis A, Sorensen HT and Norgaard M. 2008. Short-term mortality in relation to age and comorbidity in older adults with community-acquired bacteremia: a population-based cohort study. *J Am Geriatr Soc.* 56: 1593-1600

- Sonkoly E, Stahle M, Pivarcsi A. 2008. MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Seminars in Cancer Biology* 18, 131–140.
- Sontheimer EJ, Carthew RW. 2005. Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell* 122, 9-12.
- Southern E, Mir K, Shchepinov M. 1999. Molecular interactions on microarrays. *Nat. Genet.* 21, 5-9
- Stamme C, Bundschuh DS, Hartung T, Gebert U, Wollin L, Nüsing R, Wendel A, Uhlig S. 1999. Temporal sequence of pulmonary and systemic inflammatory responses to graded polymicrobial peritonitis in mice. *Infect Immun.* 67(11):5642-50.
- Stanley M. 1996. Sepsis in the elderly. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* 8, 1–6.
- Stittrich AB, Haftmann C, Sgouroudis E, Dong J, Fuhrmann F et al. 2010. The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. *Nat Immunol* 11:1057-1062.
- Streat SJ, Plank LD, Hill GL. 2000. Overview of modern management of patients with critical injury and severe sepsis. *World J. Surg.* 24, 655–663
- Suárez Y, Sessa WC. 2009. mMicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res.* 104: 442-454.
- Sullivan CS. 2008. New roles for large and small viral RNAs in evading host defences. *Nat. Rev. Genet.* 9, 503–507.
- Sun X, Icli B, Baron RM, Feinberg MW et al. 2012. MicroRNA-181b regulates NF- κ B-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest.* 122(6):1973-90.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses, *Proc Natl Acad Sci USA.* 103 12481–12486.
- Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 2005: 17(1)
- Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. 2007. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis, *Lancet Infect. Dis.* 7 210–217.
- Tang X, Tang G, Ozcan S. 2008. Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1779:697-701

- Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S and Yamaguchi K. 1996. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infect Immun*, 64: 769-774
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. 2008. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 23.455(7216):1124-8.
- ten Cate H, Schoenmakers SH, Franco R, Timmerman JJ, Groot AP, Spek CA, Reitsma PH. 2001. Microvascular coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med*. 29:S95-98
- Thai TH, Calado DP, Casola S, Rao A, Rajewsky K et al. 2007. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 316:604–608
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*. 75(2-3):291-5.
- Thiago Lopes-Carvalho, John F. Kearney. 2004. Development and selection of marginal zone B cells. In: *Immunological Reviews*. Volume 197 Issue 1, Page 192-205.
- Tili E, Croce CM, Michaille JJ. 2009. miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer. *Int Rev Immunol*. 28:264–284.
- Tolia NH, Joshua-Tor L. 2007. Slicer and the Argonautes. *Nat Chem Biol*. 3: 36–43.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Bustin SA, Orlando C, et al. 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal. Biochem*. 309: 293–300
- Trick M, Long Y, Meng J, Bancroft I. 2009. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in the polyploid *Brassica napus* using Solexa transcriptome sequencing. *Plant Biotechnol J*. 7(4):334–346.
- Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, Susumu N, Aoki D, Inazawa J. 2011. miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res*. 71(20):6450-62.
- Tucker T, Marra M, Friedman JM. 2009. Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine". *The American Journal of Human Genetics* 85(2): 142–154.

- Turnbull IR, Wizorek JJ, Osborne D, Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Buchman TG. 2003. Effects of Age on Mortality and Antibiotic Efficacy in Cecal Ligation and Puncture. *SHOCK*, Vol. 19, No. 4, pp. 310-313.
- Turvey SE, Hawn TR. 2006. Towards subtlety: understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections. *Clin Immunol.* 120(1):1-9.
- Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. 2008. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 79:581-588.
- Utech M, Brüwer M, Nusrat A. 2006. Tight junctions and cell-cell interactions. *Methods Mol Biol.* 341:185-95.
- Uzun O, Akalin HE, Hayran M, Unal S. 1992. Factors influencing prognosis in bacteremia due to gram-negative organisms: evaluation of 448 episodes in a Turkish university hospital. *Clin Infect Dis.* 15(5):866-73.
- Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. 2004. T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol Med*, 10: 119-124
- van Deventer SJH, Pajkrt D. 1997. Neutrophil adhesion molecules and MOF. *Intensiv Care Med* 23, 487-488
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 18.3(7).
- Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Popa M, Stanciulea O, et al. 2009. MicroRNA Fingerprints Identify miR-150 as a Plasma Prognostic Marker in Patients with Sepsis. *PLoS One.* 4(10):e7405.
- Vasselon T, Detmers PA 2002. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect. Immun.* 70 1033-1041
- Vasudevan S, Steitz JA. 2007. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128, 1105-1118.
- Vella MC, Reinert K, Slack FJ. 2004. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Chem Biol.* 11(12):1619-23.
- Venn J. 1881. „Symbolic Logic“. London: Macmillan. SRLF:LAGE-4334800
- Ventura A, Young AG, Winslow MM, Crowley D, Stone JR, et al. 2008. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132, 875-886.

- Viaud S, Ullrich E, Zitvogel L, Chaput N. 2008. Exosomes for the treatment of human malignancies. *Horm. Metab. Res.* 40, 82–88.
- Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. 1996. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun*, 64: 4733–4738
- Wang HJ, Zhang P, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie LX. 2012 (1). Evidence for serum miR-15a and miR-16 levels as biomarkers that distinguish sepsis from systemic inflammatory response syndrome in human subjects. *Clin Chem Lab Med.* 50(8):1423–8.
- Wang HJ, Zhang P, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie LX. 2012 (2). Evidence for serum miR-15a and miR-16 levels as biomarkers that distinguish sepsis from systemic inflammatory response syndrome in human subjects. *Clin Chem Lab Med.* 50(8):1423–8.
- Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, Zhu KM. 2010. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* 394(1):184–8.
- Weinstein WM, Onderdonk AB, Bartlett JG, Gorbach SL. 1974. Experimental intraabdominal abscesses in rats: development of an experimental model. *Infect Immun.* 10:1250–1255.
- Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. 2009. The aging of the immune system. *Transpl Int.* 22:1041–1050.
- Weiss A, Littman DR. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76: 263–274.
- Welch JS, Westervelt P, Ding L et al. 2011. Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA*, 305 (15): 1577–1584.
- Wheeler BM, Heimberg AM, Moy VN, Sperling EA, Holstein TW, Heber S, Peterson KJ. 2009. The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol Dev.* 11(1) 50–68.
- Wichterman, KA. Baue AE and Chaudry IH. 1980. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 29:189–201
- Wiedemann C, Schulz HL, Weber BHF. 2004 Quantitative Real-Time PCR– Eine Frage der Normalisierung. *BIOspektrum.* 1/04:1–4
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 75(5):855–62.

- Willenbrock H, Salomon J, Søkilde R, Barken KB, Hansen TN, Nielsen FC, Møller S, Litman T. 2009. Quantitative miRNA expression analysis: Comparing microarrays with next-generation sequencing. *RNA* 15: 2028–2034.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 249 1431-1433
- Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. 2007. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 13(18 Pt 1):5262–5270.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(11):4034-9.
- Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, Rajewsky N, Bender TP, Rajewsky K. 2007. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 131, 146–159.
- Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Kutok JL, Rajewsky K, et al. 2008. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat. Immunol.* 9, 405–414.
- Xiao C, Rajewsky K. 2009. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. *Cell*. 1316(1):26-36.
- Xiao W, Mindrinos MN, Seok J et al. 2011. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*, 208, pp. 2581–2590
- Yassour M, Kaplan T, Fraser HB, Khrebtkova I, Gnirke A. et al. 2009. Ab initio construction of a eukaryotic transcriptome by massively parallel mRNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(9):3264–3269.
- Ye D, Guo S, Al-Sadi R, Ma TY. 2011. MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology*. 141(4):1323-33.
- Young L. 1990. Gram-negative sepsis, in: G. Mandell, R. Douglas, J. Bennet (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, New York, pp. 611–636.
- Zanetti G, Heumann D, Gerain J, Glauser MP, Baumgartner JD, et al. 1992. Cytokine production after intravenous or peritoneal Gram-negative bacterial challenge: comparative protective efficacy of antibodies to TNF and to LPS. *J Immunol* 148:1890–1897.

- Zahler S, Hoffmann A, Gloe T, Pohl U. 2003. Gap-junctional coupling between neutrophils and endothelial cells: a novel modulator of transendothelial migration. *J Leukoc Biol.* 73:118–126.
- Zhao X, Guan JL. 2011. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 63(8):610-5.
- Zurcher C, van Zwieten MJ, Solleveld HA, Hollander CF. 2001. Aging research. In Foster HL, Fox DJ, Small JD, Fox JG (eds): *The Mouse in Biomedical Research*. Vol. IV. New York: Academic Press, pp 11–33.

Curriculum Vitae



Persönliche Angaben

Anschrift: E.-Thälmannstr. 10, 99718 Großenehrich
Geburtstag und -ort: 11.09.1985 in Sondershausen
Familienstand ledig
E-Mail: tobias@h-brt.de
Telefon: 01788752095

Schulische Ausbildung

1996-2004 Friedrich-von Hardenberg-Gymnasium Greußen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife („sehr gut“, 1.3)

Zivildienst

09/2004-06/2005 DRK Krankenhaus Sondershausen, Pflegeassistenz in der Inneren Medizin

Hochschulausbildung

10/2005-12/2012 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2007 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung („sehr gut“, 1.5)
02/2011-01/2012 Praktisches Jahr
Klinik für Gastroenterologie, Helios Kreiskrankenhaus Gotha, Deutschland
Klinik für Innere Medizin, Black Lion Hospital, Addis Abeba University, Äthiopien
Klinik für Chirurgie, Gondar University Hospital, Äthiopien
Klinik für Pädiatrie, Mbarara University Hospital, Uganda

10/2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung („gut“, 2.0; Gesamtnote 1.83)
05.12.2012	Erteilung der Approbation
Promotion	
06/2010-12/2013	Doktorand in der Experimentellen Anästhesie am Universitätsklinikum Jena, Center for Sepsis Control and Care CSCC. AG SepAge unter PD Dr. Ralf Claus
03.12.2013	Promotion zum Thema: <i>„Genexpressionsprofil ausgewählter leukozytärer miRNA von Mäusen verschiedenen Alters mit polymikrobieller Sepsis“</i> (Gesamtprädikat „magna cum laude“)
Berufliche Tätigkeit	
10/2006-01/2013	wissenschaftliche Hilfskraft (Tutor) am Institut für Anatomie I (Prof. Dr. Dr. Christoph Redies, Universitätsklinikum Jena)
03/2007-02/2013	studentische Hilfskraft im Universitätsklinikum Jena, Station für Allgemein- und Viszeralchirurgie

Jena, 06. Dezember 2013

Tobias Bretschneider

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Realisierung meiner Promotion ermöglichten:

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Ralf Claus für das in mich gesetzte Vertrauen, für die stete exzellente Betreuung und für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Bei Frau Dipl.-Biol. Jana Lemm und Herrn Markus Bläß für die Einführung in die labortechnische Arbeit und die Hilfen bei der Auswertung der Daten.

Bei Prof. Dr. rer. nat. Matthias Kohl für die hervorragende Zusammenarbeit bei der bioinformatischen Auswertung der *Microarray* Versuche.

Bei Frau Edith Walther, die mich in den Laboralltag einführte und mir stets meine vielen organisatorischen Fragen beantworten konnte.

Bei meinen Kollegen Dr. Markus Engelmann, Dr. Stefanie Linß und Dr. Christin Schaller die mir mit ihren Erfahrungen helfen konnten.

Und nicht zuletzt meinen Eltern, die während meines gesamten Studiums immer hinter mir gestanden haben und mich auch bei der Anfertigung dieser Promotion unterstützt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:
 - Herr PD Dr. rer. nat. habil. Ralf Claus
 - Herr Prof. Dr. rer. nat. Matthias Kohl
 - Herr Markus Bläß
 - Frau Dipl. Biol. Jana Lemm
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 05.03.2013

Tobias Bretschneider, Verfasser